

**BİYOSENSÖR HAZIRLAMADA
ENZİM KAYNAĞI OLARAK DEĞERLENDİRİLMEK
ÜZERE BAZI BİTKİSEL DOKULARIN İNCELENMESİ**

**Özhan HASANÇEBİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN-EDEBİYAT FAKÜLTESİ KİMYA BÖLÜMÜ**

**Danışman: Doç Dr. Ayten SAĞIROĞLU
EDİRNE-2008**

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOSENSÖR HAZIRLAMADA ENZİM KAYNAĞI OLARAK
DEĞERLENDİRİLMEK ÜZERE BAZI BİTKİSEL DOKULARIN
İNCELENMESİ

ÖZHAN HASANÇEBİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman
Doç. Dr. AYTEN SAĞIROĞLU

EDİRNE-2008

T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİYOSENSÖR HAZIRLAMADA ENZİM KAYNAĞI OLARAK
DEĞERLENDİRİLMEK ÜZERE BAZI BİTKİSEL DOKULARIN
İNCELENMESİ**

ÖZHAN HASANÇEBİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Bu tez 22 /10/ 2008 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Ayten SAĞIROĞLU

Doç. Dr. Yeşim YEŞİLOĞLU

Yrd. Doç. Dr. Figen ERTAN

Danışman

Üye

Üye

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET.....	I
SUMMARY	III
1. GİRİŞ	1
2. KURUMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. Fenolik Bileşikler	3
2.2. Fenolik Bileşiklerin tayin yöntemleri.....	6
2.2.1. Kromatografik yöntemler	6
2.2.1.1. Yüksek basınç sıvı kromatografisi (HPLC)	6
2.2.1.2. Gaz kromatografisi (GC)	6
2.2.1.3. Kapiler elektroforez	7
2.2.2. Spektrofotometrik yöntemler	7
2.2.2.1. Folin-ciocalteu yöntemi	7
2.2.2.2. 1,10-Fenantrolin yöntemi	7
2.2.3. Enzimatik yöntemler	8
2.2.4. Biyosensörük yöntemler	9
2.3. Kateşol	9
2.3.1. Kateşolün kullanım alanları	10
2.3.2. Kateşolün doğada bulunuşu	11
2.3.3. Kateşolün kararlılığı ve çevresel sonu	11
2.3.4. Kateşolün sağlık üzerindeki etkileri	12
2.3.5. Kateşolün insan sağlığındaki risk özellikleri	13

2.4. L-Dopa	13
2.4.1. L-Dopanin teröpatik kullanımı.....	14
2.4.2. L-Dopanin ters etkileri	15
2.4.3. L-Dopanin toksisitesi	15
2.6.4. L-Dopanin biyosentezi	15
2.4.5. L-Dopanin tarihçesi	16
2.4.6. L-Dopa içeren ilaveler.....	16
2.4.6.1. Yapıştırma ve melanin oluşumu	16
2.5. Polifenol oksidazlar (E.C.1.14.18.1)	17
2.5.1. Polifenol oksidaz aktivitesi tayin yöntemi	18
2.5.2. Bulunduğu yerler ve önemi:.....	18
2.5.3. Substratları	20
2.5.4. İnhibitörleri	20
2.6. Biyosensörlere Genel Bakış	20
2.6.1. Biyosensör ve biyosensör bileşenleri	21
2.6.2. Fiziksel bileşenler	23
2.6.3. Biyolojik oksijen biyosensörü ve çalışma prensibi	24
2.6.4. Biyobileşenler	26
2.6.5. Biyobileşenlerin immobilizasyonu	28
2.6.6. Enzim biyosensörleri	29
2.6.7. Doku biyosensörleri	30
2.6.8. Denemelerde taranan bitkisel doku örnekleri	31
2.6.8.1. Muz (<i>Musa Cavendish</i>).....	31
2.6.8.2. Yerelması (<i>Helianthus tuberosus</i>).....	33
2.6.8.3. Bakla (<i>Vicia faba</i>)	34

3.MATERYAL VE METODLAR	37
3.1.Materyal	37
3.2.Hazırlanan Çözeltiler	39
3.2.1.Spektrofotometre denemelerinde kullanılan çözeltiler	39
3.2.2.Biyosensör denemelerinde kullanılan çözeltiler	39
3.3.Metotlar	40
3.3.1.1. Ham enzim çözeltisinin hazırlanması	40
3.3.1.2. Spektrofotometre ile enzim aktivitesi tayin yöntemi	41
3.3.2.1. Doku homojenatı biyosensörlerinin hazırlanması.....	42
3.3.2.2. Doku homojenatı biyosensörleri ile ölçüm ilkesi.....	43
3.3.2.3. Kateşol tayinini için doku biyosensörleri	45
3.3.2.4. Doku biyosensörlerinin karakterizasyonları	46
 4. DENEYLER VE BULGULAR	 48
4.1.Dokulardaki PPO Aktivitelerinin Spektrofotometrik Ölçüm Bulguları.....	48
4.1.1.Trabzon kokulu-siyah üzümü.....	48
4.1.2.Yerelması	49
4.1.3.Alabaş sebzesi	49
4.1.4.Alabaş tohumu	50
4.1.5.Ayva.....	51
4.1.6.Bakla	51
4.1.7.Bezelye.....	52
4.1.8.Enginar	52
4.1.9.Fasulye (yeşil)	53
4.1.10.Güvem.....	53
4.1.11.Kaktüs (kaynanadili yaprağı)	54
4.1.12.Kereviz.....	54
4.1.13.Keçiboynuzu (kuru)	55
4.1.14.Lifli-kuru aloe vera (sarı sabır otu)	55
4.1.15.Lifsiz-kuru aloe vera (sarı sabır otu).....	56

4.1.16. Anamur muzu kabuğu	56
4.1.17. Patlıcan	57
4.1.18. Trabzon hurması	57
4.2. PPO Aktivitesi Yüksek Olan Doku Ekstraktlarının Protein tayinleri	58
4.3. Hazırlanan Doku Biyosensörlerinin Ölçüm Aralığı Analiz Bulguları	59
4.4. Doku biyosensörlerinin karakterizasyon çalışmalarına ilişkin bulgular	61
4.4.1. Lineer (doğrusal) aralık bulguları	61
4.3.2. Doku biyosensörlerinin tekrar kullanılabilirliği	64
4.3.3. Operasyon kararlılığı	65
5. TARTIŞMA	69
6. EKLER	71
7. KAYNAKLAR	80
8. TEŞEKKÜR	87
9. ÖZGEÇMİŞ	88

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil-2.1. Bazı fenolik bileşiklerin yapısı.	5
Şekil-2.2. Kateşolün kimyasal yapısı.	9
Şekil-2.3. L-Dopanı Kimyasal yapısı.	14
Şekil-2.4. Biyosensörlerin genel olarak çalışma prensibi.	21
Şekil-2.5. Biosensörlerin şematik gösterimi.	22
Şekil-2.6. Biosensörlerin yapısı ve Çalışma prensibi.	23
Şekil-2.7. : Oksijen probunun şeması.	25
Şekil-2.8. : Oksijenin reaksiyon ortamından katoda ulaşana kadar karşılaştığı difüzyon engellerinin şematik gösterimi.	26
Şekil-2.9. : Biyobileşen hazırlanmasında en çok kullanılan immobilizasyon Yöntemleri.	29
Şekil-2.10. : Muz ağacı ve meyvesinin genel görüntüsü.	32
Şekil-2.11. : Yerelması bitkisinin genel görüntüsü.	33
Şekil-2.12. : Yerelması bitkisinin çiçeği ve kökleri.	34
Şekil-2.13. : Bakla bitkisinin çiçek açmış hali.	35
Şekil-2.14. : Baklanın iç görüntüsü.	35
Şekil-3.1. : Doku homojenatı temelli biyosensörler ile ölçüm alınırken deney düzeneğin ve kullanılan sürkülasyonlu su banyosunun resmi.	44
Şekil-3.2. : Doku homojenatı biyosensörlerinin biyoaktif tabakalarının Şematik gösterimi.	45
Şekil-4.1. : Trabzon siyah -kokulu üzümü ekstraktının farklı hacimlerinin spektrofotometredeki absorbans değişimleri.	48
Şekil-4.2. : Yerelmasının ekstraktının farklı hacimlerinin spektrofotometredeki absorbans değişimleri.	49

Şekil-4.3. : Alabaş sebzesi ekstrakt hacimlerinin spektrofotometredeki	
absorbans değişimleri.	50
Şekil-4.4. : Alabaş tohumu ekstraktının farklı hacimlerinin spektrofotometredeki	
absorbans değişimleri.	50
Şekil-4.5. : Ayva ekstraktının farklı hacimlerinin spektrofotometredeki	
absorbans değişimleri.	51
Şekil-4.6. : Bakla ekstraktının farklı hacimlerinin spektrofotometredeki	
absorbans değişimleri.	51
Şekil-4.7. : Bezelye ekstraktının farklı hacimlerinin spektrofotometredeki	
absorbans değişimleri.	52
Şekil-4.8. : Enginar ekstraktının farklı hacimlerinin spektrofotometredeki	
absorbans değişimleri.	52
Şekil-4.9. : Fasulye (yeşil) ekstraktının farklı hacimlerinin spektrofotometredeki	
absorbans değişimleri.	53
Şekil-4.10. : Güvem ekstraktının farklı hacimlerinin spektrofotometredeki	
absorbans değişimleri.	53
Şekil-4.11. : Kaktüs (kuru) ekstraktının farklı hacimlerinin spektrofotometredeki	
absorbans değişimleri.	54
Şekil-4.12. : Kereviz ekstraktının farklı hacimlerinin spektrofotometredeki absorbans	
değişimleri.	54
Şekil-4.13. : Keçiboynuzu (kuru) ekstraktının farklı hacimlerinin spektrofotometredeki	
absorbans değişimleri.	55
Şekil-4.14. : Aloe veranın (kuru-Lifli) ekstraktının farklı hacimlerinin	
spektrofotometredeki absorbans değişimleri.	55
Şekil-4.15. : Aloe veranın (kuru-Lifsiz) ekstraktının farklı hacimlerinin	
spektrofotometredeki absorbans değişimleri.	56
Şekil-4.16. : Anamur muzı kabuğu ekstraktının farklı hacimlerinin	
spektrofotometredeki absorbans değişimleri.	56

Şekil-4.17. : Patlıcan ekstraktının farklı hacimlerinin spektrofotometredeki absorbans değişimleri.	57
Şekil-4.18. : Trabzon ekstraktının farklı hacimlerinin spektrofotometredeki absorbans değişimleri.	57
Şekil-4.19. : Anamur muzu kabuğu biyosensörü için kateşol konsantrasyonuna karşı çözünmüş oksijen değişimi.	59
Şekil-4.20. : Yerelması biyosensörü için kateşol konsantrasyonuna karşı çözünmüş oksijen değişimi.	60
Şekil-4.21.a. : Bakla biyosensörü için kateşol konsantrasyonuna karşı çözünmüş oksijen değişimi.	60
Şekil-4.21.b. : Bakla biyosensörü için L-Dopa konsantrasyonuna karşı çözünmüş oksijen değişimi.	60
Şekil-4.22. : Muz kabuğu biyosensörünün lineer aralık kalibrasyon grafiği.	62
Şekil-4.23. : Yerelması biyosensörünün lineer aralık kalibrasyon grafiği.	62
Şekil-4.24. : Bakla biyosensörünün lineer aralık kalibrasyon grafiği.(kateşol)	63
Şekil-4.25. : Bakla biyosensörünün lineer aralık kalibrasyon grafiği (L-Dopa).	63
Şekil-4.26. : Muz kabuğu doku biyosensörünün kateşol tayinine yönelik operasyon kararlılığı.	66
Şekil-4.27. : Yerelması doku biyosensörünün kateşol tayinine yönelik operasyon kararlılığı.	66
Şekil-4.28. : Bakla doku biyosensörünün kateşol tayinine yönelik operasyon kararlılığı.	67
Şekil-4.29. : Bakla doku biyosensörünün L-Dopa tayinine yönelik operasyon kararlılığı.	67

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo-2.1. : Kateşölün kimyasal ve fiziksel özellikleri.	10
Tablo-2.2. : Fiziksel bileşen olarak kullanılan İletim Ve Ölçüm Sistemleri. . . .	24
Tablo-2.3. : Biyobileşen olarak kullanılan enzim kaynaklarının birbirleri arasındaki avantaj ve dezavantajları.	27
Tablo-3.1. : Spektrofotometrede taranan bitki dokularının bazı özellikleri. . . .	37
Tablo 3.2. : Deneylerde kullanılan araç ve gereçler.	38
Tablo 3.3. : Deneylerde kullanılan kimyasallar ve markaları.	39
Tablo-3.4. : Enzim çözeltilerinin hazırlanması.	41
Tablo-3.5 : Doku homojenatı kullanılarak jelatin tabanlı biyosensörlerin hazırlanması.	43
Tablo-4.1. : PPO aktivitesi yüksek olan dokuların toplam protein miktarları. . .	58
Tablo-4.2. : Ayva, yerelması, bakla ve muz kabuklarının 0.02 M Kateşöl substratına karşı spesifik aktivite değerleri.	58
Tablo-4.3.: Doku biyosensörlerinin standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri.	64

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Cu

Açıklama

Bakır elementi

Kısaltmalar

HPLC

Açıklama

Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi

GC

Gaz Kromatografisi

ET

Elektron Transferi

HAT

Hidrojen Atomu Transferi

CZE

Kapiler Zone Elektroforezi

PPO

Polifenol Oksidaz

DNA

Deoksiribonükleik asit

IUPAC

International Union of Pure and Applied Chemistry

COMT

Kateşol-o-metil transferaz

VLA

Vanilaktik asit

3-OMD

3-o-metildopa

L-DOPA

Levodopa

ÖZET

Bu çalışmada; 17 farklı bitkisel dokunun, farklı hacimlerdeki ham enzim ekstraktlarının spektrofotometrik yöntemle polifenol oksidaz (PPO) aktivitelerinin incelenmesi ve PPO aktivitesi yüksek olan dokuların kullanılmasıyla hazırlanan biyosensörlerin fenolik bileşik tayinine yönelik olarak uygulanabilirliklerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Anamur muz kabuğu, yerelması, bakla, siyah-kokulu üzüm, güvem, fasulye, bezelye, kurutulmuş kaktüs, kuru aloe vera (lifli ve lifsiz), alabaş tohumu, alabaş sebzesi, kereviz, ayva, enginar, patlıcan, Trabzon hurması ve kuru keçiboynuzunun farklı ham enzim ekstraktlarının spektrofotometrik yöntemle 0.02 M kateşol varlığında Polifenol oksidaz aktiviteleri tarandı. Spektrofotometrik tarama sonunda, Polifenol oksidaz aktivitesi diğer dokuların tümünden daha yüksek bulunan Anamur muz kabuğu, yerelması ve baklanın spesifik aktivite değerleri belirlendi ve biyosensörlerde biyobileşen olarak denenmelerine karar verildi. Deneysel çalışmalarda, standart substrat olarak kateşol kullanıldı. Ayrıca, bakla dokusu için ikinci substrat olarak L-Dopa kullanıldı.

Kateşol tayin sınırları, **yerelması** biyosensöründe 2-10 μM , **Muz kabuğu** biyosensöründe 5-40 μM ve **bakla** biyosensöründe 10-100 μM olarak bulundu. Ayrıca, L-Dopa tayinine yönelik bakla dokusu biyosensörü için tayin sınırı 0,5-5 μM aralığında belirlendi.

Daha sonra tekrar kullanılabilirlik ölçümleri yapıldı ve bu işlemler sonucunda, kateşol tayinine yönelik seçilen bitki dokuları için standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri sırayla şöyle bulundu: **Muz kabuğu** dokusu için $\pm 0.3294 \mu\text{M}$ ve % 1.4, **yerelması** dokusu için $\pm 0.0746 \mu\text{M}$ ve % 1, **bakla** dokusu için $\pm 0.8392 \mu\text{M}$ ve %2' dir. Ayrıca, **bakla** dokusu için L-Dopa tayinine yönelik değerler ise; standart sapma $\pm 0.0558 \mu\text{M}$ ve varyasyon katsayısı % 1.8 olarak belirlendi.

En son olarak operasyon kararlılıkları denemeleri yapıldı. Hazırlanan biyosensörler, 6 şar kez (180 dk) ölçümler sonunda, bu üç doku sensörü için PPO aktivitelerinde hiç azalma olmadı. Ancak, on ikinci kez yapılan (360 dk) ölçümlerden

sonra **muz kabukları** biyosensöründe % 45, **yerelması** biyosensöründe % 35 ve **bakla** biyosensöründe % 46 aktivite kaybı görüldü. Ayrıca, L-Dopa tayinine yönelik **bakla** biyosensörünün aktivitesinde de % 42 azalma görüldü.

Sonuç olarak; PPO aktivitesi yüksek bulunan bu üç bitkisel doku ile fenolik bileşiklerinin tayinine yönelik bitkisel doku temelli biyosensör hazırlandı. Kateşol tayini için bütün dokularla, L-Dopa için bakla dokusuyla; lineer ölçüm aralıkları yeterli, tekrar kullanılabilirlikleri fazla ve operasyon kararlılıkları yüksek ekonomik ve kullanışlı biyosensörler elde edildi.

SUMMARY

In this study, examination of polyphenol oxidase (PPO) activities at different volumes of crude enzyme extracts of 17 different herbal tissues with spectroscopic methods and inquisition of applicability of biosensors prepared with tissues which have high PPO activities were aimed.

Polyphenol oxidase activity in presence of 0.2 M catechol of Anamur banana peel, jerusalem artichoke, broad bean, black-flavoured grape, buckthorn, bean, pea, dried cactus, dry alovera (fibrious and nonfibrious), cabbage turnip graim, cabbage turnip vegetable, celeriac, quince, artichoke, aubergine, Trabzon palm, dry carob's different crude enzyme extracts were analyzed with spectrophotometric method. In the end of spectrophotometric analysis, specific activity values of Anamur banana peel, jerusalem artichoke and broad bean that have higher polyphenol oxidase activity than other tissues were determined and there tissues were decided usage as biocompanent at the biosensörs. In the experimental studies catechol was used as a sustrate. Also, L-Dopa as a second substrate was used for broad bean.

As a result, 2-10 μM for jerusalem artichoke biosensor, 5-40 μM for banana peel biosensor and 10-100 μM for broad bean biosensor were found as a catechol determination limits. Also, broad bean biosensor's determination limit was found between 0.5-5 μM for L-Dopa determination.

After that, again usage measurements were made and in the end of these measurements, the values for determination of catechol were found as standart deviation is $\pm 0.3294 \mu\text{M}$ and variation coefficient is 1.4% for banana peel, $\pm 0.0746 \mu\text{M}$ and 1.0035% for jerusalem artichoke, $\pm 0.8392 \mu\text{M}$ and 2% for broad bean respectively. Also, these values of broad bean tissue for L-Dopa determinations calculated as, standart deviation is $\pm 0.0558 \mu\text{M}$ and variation coefficient is 1.8%.

Operation stability examinations were made. Activity losses were not observed after 6 measurements (180 min). But activity losses were observed after 12 measurements (360 min) 45% for banana peel biosensor, 35% for jerusalem artichoke

and 46% for broad bean biosensor. Also, activity loss of broad bean biosensor for L-Dopa determination was calculated as 42%.

Consequently, three different herbal tissues have higher PPO activities were developed for determination of phenolic compounds by herbal tissue based biosensors. For catechol determination with three herbal tissues and for L-Dopa determination with broad bean tissue. Were obtained economically and use fully biosensors which were linear measurement limits necessities the higher of again uses measurements and operational stabilities.

1. GİRİŞ

Tüm canlılar yaşadıkları ortamlardaki değişimleri derhal algılayıp, yaşamları sürdürebilmek için değişimlere uymaya çalışırlar. İşte bu algılama mekanizması biyosensörlerin *in vitro* kullanımı için temel oluşturmuştur.

Canlılar, teknologların hayal bile edemeyeceği duyarlık performansı gösterirler. Örneğin; bazı köpeklerin koku almaları insanlardan 100.000 kat daha duyarlıdır. Yılan balıkları tonlarca su içersine ilave edilen birkaç damla yabancı maddeyi derhal algırlar. Kelebekler partnerlerinin yaydığı birkaç molekülü bile hissederler. Algiler ise zehirli maddelere karşı çok duyarlıdır.

Canlılara bu uyarıları algılamayı mümkün kılan biyolojik maddelerin analiz sistemleri ile birleştirilmesi biyosensörleri doğurmuştur. Biyosensör teknolojisi çok hızlı gelişmektedir. Biyosensörlerin gelişiminde, mikro-elektronikten bildiğimiz daima daha küçük, daha doğru ve daha ucuz aletlere eğilim görülmektedir.

Biyokomponentlerden ve fiziksel komponentlerden oluşan biyosensörlerin görevi; biyolojik bir olayın elektrik sinyaline dönüştürülmesidir.

Biyosensörler tıp, tarım gıda, eczacılık, çevre kirliliği, savunma ve birçok endüstriyel aktivitede özellikle otomasyon, kalite kontrolü, durum tespiti ve enerji saklanması çok önemli rol oynarlar. Ayrıca, gıda maddeleri, metabolitler, vitaminler, antibiyotikler, ilaçlar gibi organik maddeler, bazı anorganik bileşikler, enzimler, virüsler ve mikroorganizmaların tayininde de kullanılırlar (Telefoncu, 1999).

Kateşol, *Mycorrhiza* (kök mantarı) ve Douglas pine de (*Pinaceae* ailesinden bir çam türü) ince bir tabaka halinde (tannin katmanı içinde); meşe ve söğütlerin dal ve yapraklarında doğal olarak bulunur. Elma, patates ve rafine zeytinyağı gibi çeşitli yiyeceklerde de bulunmaktadır. Kateşol çok farklı endüstrilerde kullanım alanı bulmuş bir fenolik bileşiktir. Tıp da kanama durdurucu, antiseptik olarak, fotoğrafçılıkta, elektrolitik kaplama proseslerinde ve diğer bazı kimyasalların üretimi gibi alanlarda kullanılmaktadır. Kateşol endüstriyel olarak üretildiği gibi orijinal olarak bir çeşit mimoza ağacından da izole edilmektedir. Kateşol standardı varlığında fenolik

bileşiklerin tayini; kromatografi, spektrofotometri, biyosensörler gibi teknikler kullanılarak yapılmaktadır.

Bu çalışmanın amacı; öncelikle, seçilen bazı bitkisel dokuların içerdiği polifenol oksidaz aktivitelerinin spektrofotometrik yöntemle taranması ve polifenol oksidaz aktiviteleri daha yüksek olduğu bulunan Anamur muz kabuğu, yerelması ve bakla dokularının fenolik bileşik tayinine yönelik biyosensör hazırlamada enzim kaynağı olarak uygulanabilirliklerinin incelenmesidir.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Fenolik Bileşikler

Fenolik maddeler, bitkisel doğal bileşiklerin geniş bir bölümünü kapsar, en az bir aromatik halka ve halkada çok miktarda hidroksil substitüenti bulunduran bileşiklerin tümüne denir. Fenolik maddeler, suda çözünebilirler, şekerlerle glikozidler şeklinde çok sık birleşmiş halde olurlar ve genellikle hücrenin vakuollerinde yerleşmişlerdir.

Bitkilerdeki fenolik bileşikler; Fenoller ve Fenolik asitler, Fenil propanoidler, Flavanoidler (Flavanoid pigmentleri) ve Kinon Pigmentleri olmak üzere 4 farklı grupta toplanırlar. Fenil propanoidler de sinamik asitler, kumarinler, fenil propenler ve lignanlar alt gruplarına ayrılır. Aynı zamanda flavonoidler de antosiyaninler, lokoantosiyaninler, flavonoller, flavonlar, glukoflavonlar, biflavoniller, kalgonlar, auronlar, flavononlar ve izoflavonlar halinde alt gruplarda incelenir. Bazı fenolik bileşiklerin yapıları Şekil-2.1. de verilmiştir.

Geniş bir bileşik spektrumunu bulunduran fenolik bileşikler, bitkilerde farklı fonksiyonları üstlenmişlerdir. Örneğin, ligninlerin bir yapı elementi olarak hücre duvarındaki işlevi, antosiyaninlerin birçok çiçek cinsinin renk pigmenti olarak işlevi ve flavonoidlerin antioksidan ve bitkileri enfekte edicilere karşı koruma işlevleri bilinmektedir.

Bitki biyokimyasına göre de bitki fenollerini insan beslenmesinde önemli olabilirler. Çünkü, hidrojen bağlarıyla proteinlerle birlikte kompleks oluşturabilirler.

Fenolik bileşikler, bitkilerdeki enzimatik kararma olaylarından da sorumludurlar. Örneğin; elma, muz ve armudun kararması gibi.

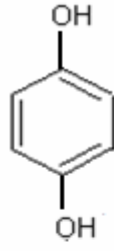
Fenolik pigmentlerin doğal görünür renkli olanları, izolasyon ve saflaştırma sırasında kısmen yada tamamen kolayca belirlenirler. Fenolik bileşiklerin tümü aromatik ve bu yüzden spektrumun ultraviyole ve UV 'ye yakın görünür bölgede şiddetli absorbans gösterirler ve bu sebeple de renklidirler.

Bazı fenolik bileşikler tıpkı askorbik asit gibi antioksidan olarak etkilidirler. Bitkisel ağırlıklı beslenmenin fenolik bileşikler bakımından yoğun olmasından dolayı radikal oluşumunu azaltırlar ve kanser riskini de azaltarak sağlık üzerine olumlu etki yaparlar (Sağıroğlu, 2003).

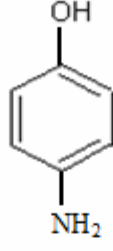
Fenolik bileşikler; patlatıcı madde, farmasötik, plastik, kağıt, boya, ilaç, peptisit ve antioksidanların üretimi gibi birçok proste kullanıldıkları için organik kirliliklerin büyük bir kısmını oluşturlar. Belirli fenoller ve bazı aromatik bileşikler yüksek oranda toksik, kanserojen ve alerjen özellik gösteren maddelerdir. Bunların toksik etkilerinden dolayı tayarleri ve çevreden uzaklaştırılmaları büyük önem taşır (Haghighi v.d. ; 2003; Timur v.d. , 2003).

Ayrıca, fenoller aromatik bileşikler arasında en önemlisi olarak bilinirler; monohidroksifenoller, kresoller ve polihidroksifenoller olmak üzere 3 grupta toplanırlar (YTÜ Çevre Müh. Böl. Çevre Kimyası 2 Lab. Notları).

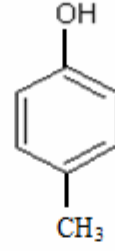
Para-süstitüe olmuş fenoller



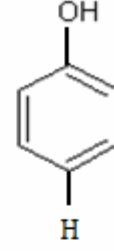
Hidrokinon



4-Aminofenol

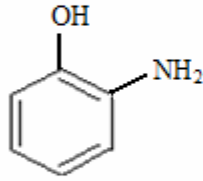


p-Krezol

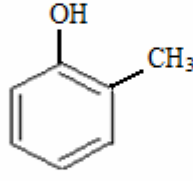


Fenol

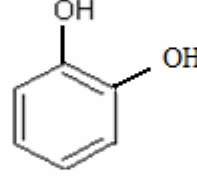
Orto-süstitüe olmuş fenoller



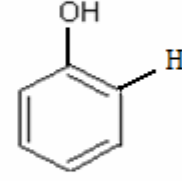
2-aminofenol



o-krezol

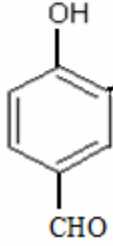


kateşol

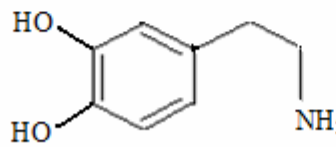


Fenol

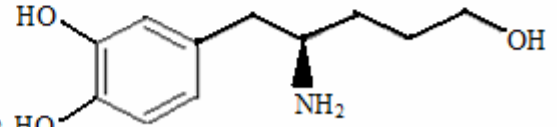
Para-süstitüe olmuş orto-difenoller



3,4-dihidroksi
benzaldehit

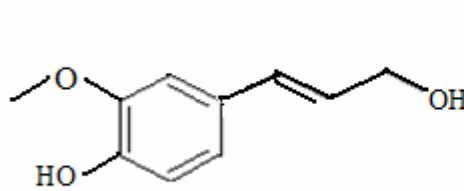


Dopamin

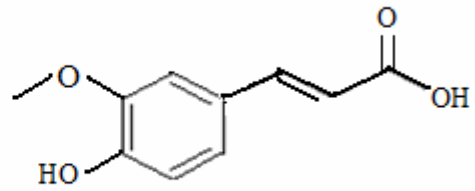


L-DOPA

Para-süstitüe olmuş orta-metoksi fenoller



Koniferil alkol



Ferullik asit

Şekil-2.1. : Bazı fenolik bileşiklerin yapısı (Sağıroğlu, 2003).

2.2. Fenolik Bileşiklerin Tayin Yöntemleri

Fenolik bileşiklerin tayininde; kromatografik, spektrofotometrik, enzimatik ve biyosensörük yöntemler kullanılmaktadır. Son yıllarda da biyosensörlere dayalı analizler, araştırmaların yoğunlaştığı bir alandır. Fenolik bileşiklerin günümüzde en çok kullanıldığı tayin yöntemleri aşağıda kısaca açıklanacaktır.

2.2.1. Kromatografik yöntemler

Fenolik bileşiklerin tayininde kullanılan kromatografik yöntemlerin başlıcaları, Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi, Gaz Kromatografisi, Kapiler Elektroforez gibi yöntemlerdir.

2.2.1.1. Yüksek basınç sıvı kromatografisi (HPLC)

Yüksek performans sıvı kromatografisi birçok fenolik bileşiğin tayininde kullanılan analitik bir yöntemdir. Esası, polar çözücülerde çözünebilen fenolik bileşik sınıfı üyeleri HPLC ile tayin edilirler.

Yapılan bir çalışmada uygulanan metot, fenolik bileşiklerin (25 tane seçilmiş fenolik bileşiğin) tek tek ayrılmasına ve elektrokimyasal olarak maksimum duyarlı bir şekilde optimize edilmelerine dayanmaktadır (Kahoun v.d. , 2008).

2.2.1.2. Gaz kromatografisi (GC)

Gaz kromatografisi; kimya alanında gazların ve uçucu hale getirilebilen maddelerin ayrılmasında uygun bir metot olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Bir çalışmada; tosilat türevli fenollerin iyon-eşleşme destekli ekstraksiyon ve mikro ekstraksiyon türevlendirme teknikleri reaksiyonlarıyla işbirliği içindedir. Aynı zamanda gaz kromatografisi yüksek seçicilik ve duyarlılık göstermektedir (Fiamegos v.d. , 2008).

2.2.1.3. Kapiler elektroforez

Elektroforez, iletken bir çözelti içindeki yüklü-yüksüz parçacıkların veya moleküllerin bir elektriksel alan varlığında göç etmesine dayanan bir ayırma ve tayin yöntemidir.

Kapiler elektroforezin kısa analiz süresi, küçük numune hacmi, az miktarda çözelti harcanması, ucuz olması, tekrarlanabilir olması ve kullanım alanının geniş olması gibi avantajları vardır.

Kapiler elektroforezin uygulandığı bir çalışmada göç zamanı, sıcaklık, voltaj, elektrolit cinsi, organik materyalin içeriği gibi kullanılacak materyaller lignin benzeri fenolik bileşikler için Kapiler Bölge Elektroforezi' nde (CZE) optimize edilmiştir. (Lima v.d. , 2007).

2.2.2. Spektrofotometrik yöntemler

2.2.2.1. Folin-ciocalteu yöntemi

Bu yöntemde, numune içindeki toplam fenol miktarı folin reaktifi kullanılarak kolorimetrik olarak tayin edilir. Değişen renklerin absorbansı 750nm de spektrofotometre de okunarak tayin edilmiştir (Öztürk v.d. , 2002).

2.2.2.2. 1,10-Fenantrolin yöntemi

Gıda maddelerindeki antioksidanların tayini besin maddelerinin kalitesini ortaya koyarken insan kan plazmasındaki antioksidan kapasitesinin ölçülmesi de çeşitli hastalıkların saptanması, kontrolü ve tedavisi için önemlidir. Toplam antioksidan tayini, bunların katıldıkları çeşitli reaksiyonların dönüşüm verimine veya hızlarına ya da her ikisine bağlı olarak yapılır. Literatürde verilen antioksidan tayinlerinde temel sınıflandırma reaksiyon tipidir. Antioksidan tayinleri elektron transferine (ET) veya hidrojen atomu transferine (HAT) ne dayanır (Apak v.d. , 2004).

Antioksidanların sağlığa yararlı etkilerinin bunların sinerjik kombinasyonlarıyla da sağlandığını göz önüne alarak her ortama uygulanabilen toplu bir antioksidan kapasite tayin yöntemine ihtiyaç vardır. Dolayısıyla besin yoluyla alınan polifenoller, C ve E vitaminleri, flavonoidler ve glukozidleri ile plazma antioksidanları için geçerli olabilecek hem hidrofilik hem de lipofilik maddeler için elverişli, basit, ucuz, pratik, seçici ve duyarlı bir antioksidan kapasite tayin yöntemini tanımlamaktır. Bu amaçla geliştirilen spektrofotometrik metot, antioksidan çözeltisinin, bakır (II) klorür çözeltisi, neokuproinin alkoldeki çözeltisi ve pH:7,0 amonyum asetat sulu tampon çözeltisi ile karıştırılması ve ardından oluşan Cu(I)-neokuproin kelatının absorbansının 450 nm de okunmasını içerir.

Tayinde radikalik türler olmamasına rağmen örneğin toplam antioksidan gücünü etkin bir şekilde doğrudan yansıtır. (Apak v.d. , 2005)

1,10-Fenantrolin ve türevleri çok dişli ligand özelliği gösterdiğinden, geçiş metallerinin çoğu ile kararlı koordinasyon bileşikleri oluşturur ve bu özelliğinden dolayı literatürlerde pek çok çalışmaya konu olmuştur. 1,10-fenantrolinin düzlemsel hetero-halkalı bir yapıya sahip olmasından dolayı, geçiş metalleriyle oluşturduğu kararlı kompleksleri alan etkili transistörler, ışık yayan diyotlar, lazerler ve fotovoltaiik piller gibi pek çok elektronik cihaz tasarımında yaygın olarak kullanılmaktadırlar. 1,10-fenantrolin, sahip olduğu yüksek yük transfer hareketliliği, mor ötesi spektral bölgedeki güçlü soğurumları, parlak ışık yaymaları, iyi foto aktif özelliklerinden dolayı lüminesans bazlı optik sensörlerin geliştirilmesinde de kullanılmaktadır (Şerbetçi ve Alkan, 2008).

2.2.3. Enzimatik yöntemler

Fenolik bileşiklerin tayininde genelde enzimlerin immobilize formların kullanıldığı enzimatik yöntemler denenmiştir. Buna yönelik yapılan bir çalışmada saf olarak izole edilmiş polifenol oksidaz enzimi kullanılarak kırmızı şarap içerisindeki toplam fenol miktarı tayin edilmiştir (Yıldız v.d. , 2006).

Enzimatik yöntemin kullanıldığı başka bir çalışmada, ayvadan izole edilen polifenol oksidaz enziminin kateşol substratında aktivitesi enzimatik yöntemle tayin edilmiştir (Yağar, 2000).

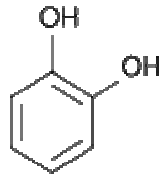
2.2.4. Biyosensörük yöntemler

Fenolik bileşiklerin belirlenmesinde genelde saf enzim, doku ve mikroorganizma temelli sensörler geliştirilmiştir. Yapılan bir çalışmada elektrot üzerine immobilize edilmiş polifenol oksidaz enzimi ile amperometrik olarak fenolik bileşikler tayin edilmiştir (Gutes v.d. , 2005). Biyosensörler, uzun depo kararlılığı, kısa analiz süresi, substrat spesifikliğı gibi konularda birçok avantajlara sahiptir ve tüm laboratuarlarda kolaylıkla uygulanabilecek yöntemlerdir. Analizlerin tekrarlanabilirliğı oldukça yüksektir. Ayrıca yöntem zaman alıcı değildir, pahalı cihazlara ve kimyasallara gerek duymaz (Akyılmaz, 1996).

2.3. Kateşol

Genellikle kateşol olarak bilinen pirokateşol $C_6H_6O_2$ formülüne sahip bir organik bileşiktir. Üç izomerik benzen-diol den biridir. Bu renksiz bileşik doğal olarak meydana gelir. Fakat her yıl yaklaşık 20.000 ton imal edilir. Peptisitlerin, çeşnilerin (tatların) ve güzel kokuların öncüsüdür (<http://en.wikipedia.org/wiki/Catechol>).

Şekil-2.2. de kateşolün kimyasal formülü verilmiştir. Tablo-2.1.' de de kateşolün kimyasal ve fiziksel özellikleri toplanmıştır.



Şekil-2.2. : Kateşolün kimyasal yapısı (<http://en.wikipedia.org/wiki/Catechol>).

Tablo-2.1. : Kateşolün kimyasal ve fiziksel özellikleri.

IUPAC İsmi	• pirokateşol
Diğer isimleri	• Kateşol • Benzen 1,2-diol • 2-Hidroksi fenol • α- Hidroksi fenol • o- Hidroksi fenol • o-benzen diol • 1,2-dihidroksi benzen • Pirokateşin
Molekül formülü	• C ₆ H ₆ O ₂
Molekül ağırlığı	• 110,11 gr/mol
Görüntüsü	• Beyaz-katı
Yoğunluğu	• 1,344 gr/cm ³
Erime noktası	• 105 °C
Kaynama noktası	• 245,5 °C
Sudaki çözünürlüğü	• 43 g/100ml
Asiditesi (pKa)	• 9,5

2.3.1. Kateşolün kullanım alanları

1,2-benzendiolün (kateşol), 2006 yılında Kanada’ da imal edilen toplam miktarları sırası ile 1.000.000 ve 10.000.00 kg dır dır. Ulusal hava ve akarsu ilerleme ve denetleme konseyine göre 1,2-benzendiol geri kazanma proseslerin de hemen hemen yok edilir (Canada, 2007). Bazı 1,2-benzendiol hamurlaştırma esnasında kaybolrsa bile kâğıt hamuru ve kâğıt imalat atıklarına girer. Bunlar atık su muamele sisteminde tipik olarak uzaklaştırılır (Ncasi, 2007).

Kateşol çok farklı endüstrilerde kullanım alanı bulmuş bir fenolik bileşiktir. Bu endüstri dallarından bazıları şöyle sıralanabilir; tıp (kanama durdurucu, antiseptik olarak), fotoğraf, elektro kaplama prosesleri ve diğer bazı kimyasalların üretimidir. Kateşol endüstriyel olarak üretilbildiği gibi orijinal olarak bir çeşit mimoza ağacından da izole edilebilmektedir (Sezgintürk v.d, 2007).

Kanada Çevre Endüstrisi tarafından önerilen gönüllü verilere dayanarak 1,2-benzendiol, küçük miktarlarda laboratuvar reaktifi olarak işlenmemiş materyal testleri için farmasötik endüstride kullanılır. Proses esnasında, tamamen okside olduğu akımla

kaplı banyolarda antioksidan olarak kullanılır. Kozmetikte kullanımı yasaktır. Diğer potansiyel kullanım alanları ise; kürk boyamada geliştirici, kauçuk polimerizasyonunda ve yağlardaki antioksidanlar için bir ara ürün, farmasötik endüstride inhibitör olarak kullanılmasıdır. Bunlardan başka 1,2-benzendiol; yapışkan sentezinde, faks kağıtlarında ve özel mürekkeplerde reaktif olarak kullanılır. Geçmişte saç boyalarında oksitleyici ajan olarak, parfüm ve endüstriyel yağlarda ise antioksidan olarak kullanılırdı.

2.3.2. Kateşolün doğada bulunuşu

1,2- benzendiol olarak da bilinen kateşol, mycorrhiza (kök mantarı) ve Douglas pine de (*Pinaceae* ailesinden bir çam türü) ince bir tabaka halinde (tannin katmanı içinde); meşe ve söğütlerin dal ve yapraklarında doğal olarak bulunur. Elma, patates ve rafine zeytinyağı gibi çeşitli yiyeceklerde de bulunmaktadır (Marshall, 2000; Brenes v.d. , 2004; Sternitzke v.d. , 1992; Singh v.d. , 1994; McDonald v.d. , 2001).

Kateşol, sigara ve odun dumanında teşhis edilmiştir (Roemer v.d. , 2004; Fine v.d. , 2001; Fine v.d. , 2002). Başka bir kaynağı da insan vücudundaki benzen metabolizmasıdır (Medeiros ve Bird, 1997).

1,2-benzendiolün et ve tavuktaki varlığında, yiyecek ve içeceklerdeki 1,2-benzendiol kaynakları göz önüne alındığında doğal olarak meydana gelir. Diğer ortamlardan (hava, su, toprak) toplam alım-katılımı; 1,4-benzendiol yapımı ve endüstriyel kullanımı hesaba katılınca, yiyecek ve içeceklerden alınan miktarın yanında önemsizdir (Canada, 2007).

2.3.3 Kateşolün kararlılığı ve çevresel sonu

Fiziksel ve kimyasal özelliklerine ve ağırlık üzerindeki deneysel azalmaya dayanarak; 1,2-benzendiolün kararlılık kriterlerine uymadığı görülmüştür.

Yarı ömrü (havada) ≥ 2 gün,

Toprak ve soda ≥ 182 gün

Çözeltide ≥ 365 gündür. (Canada, 2000)

1,2-benzendiol suda yüksek çözünürlüğe ve orta derecede toprak adsorbsiyon katsayısına sahiptir. Eğer ki, suya verilirse suda kalıcıdır. Toprakta mikroorganizmalarla parçalanır. Havaya bırakılan kateşol oksitlenmesi beklenir. 1,2-benzendiol suda yüksek çözünürlüğü sayesinde ıslak tortu prosesi potansiyeli ile atmosferden ayrılabilir (Epiwin, 2004).

2.3.4. Kateşolün sağlık üzerindeki etkileri

Hayvanlar üzerinde yapılan bir deneyin 1,2-benzendiolün sağlık üzerindeki yararlı etkisini göstermiştir. İnsanlar üzerindeki etkileri sınırlı ve verilerin güvenliği azdır. İnsanların 1,2-benzendiol ile direkt termal teması ile egzama tarzı hastalıklar olabilir ve derinin fenol teması sonucu gösterdiği tepkiye benzer semptomlar gösterir. Bu etkilerin akut ve kronik olup olmadığı belirgin değildir. 1,2-benzendiole maruz kalan ve 2 yıl fenolle çalışan Japonların kontrol gurubunda farklı olarak boğaz ağrısı, öksürük, göz iltihaplanması ve deride bozulmalar gibi rahatsızlıklara yakalanmışlardır. Kozmetiklerde ise bazı bayanların 1,2-benzendiolün alerjik reaksiyonlara sebep olduğu 1-2 deneyle gösterilmiştir (Hagiwara v.d. , 2001).

Hayvanlar üzerinde yapılan bazı deneyler sonucunda Uluslararası Kanser Araştırma Merkezi 1,2-benzendiolü insan açısından aromatik yapılı olduğundan ‘muhtemel karsinojenik’ olarak sınıflandırılmıştır. Uzun dönem 1,2-benzendiolü beslenmeleri sonucu fareler üzerinde yapılan deneylerde adenokarsinoma bezelerine sebep olduğu görüldü, fakat bu olayla ilgili güvenilir bir kanıt bulunmamaktadır. Aynı deneylerde erkek farelerde hiperplazi, bezesel hiperplazi (organların normalinden fazla büyümesi) görülmüştür. Hiperplazi miktarı günlük verilen 1,2-benzendiol miktarıyla orantılıdır. Çok yüksek doz verildiğinde adenokarsinoma 25 fareden 3 ünde görülmüştür.

1,2-benzendiolün *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarında genotoksik olduğu görülmüştür. Memeli hücre kültüründe gen mutasyonlarına, kromosomal sapmalara ve kardeş kromatid değişimlerine sebep olduğu görülmüştür. 1,2-benzendiol DNA’ da boncukların kırılmasına, gen mutasyonuna, kromozomal sapmalara, kromozom sayısında değişiklik (aneuploidy) ve hücre transformasyonuna, insan olmayan memeli

hücrelerinde sebep olduğu görülmüştür. Bununla beraber, değerlendirmelerin kapsamında non-genotoksik mekanizmalarda 1,2-benzendiölün karsinojenik etkisi görüldü. Toksisitenin yol açtığı hücre proliferasyonu (çoğalma) üzerindeki rejenerasyon etkisi; farelerde mide tümörüne neden olmuştur. Buna rağmen tümörün gelişimiyle ilgili genetik hasarın potansiyel rolü engellenememiştir. 1500 mg/m³ 1,2-benzendiole 8 saat süreyle solunum yoluyla maruz kalan farelerde toksisite izi görülmemiştir. 2000-2800 mg/m³ 1,2-benzendiole maruz kalan bazı hayvanlarda tırnak ve başparmakta aşırı tahriş gözlenmiştir. Yine de toksikolojik verilerin güvenilirliği azdır (Hagiwara v.d. , 2001).

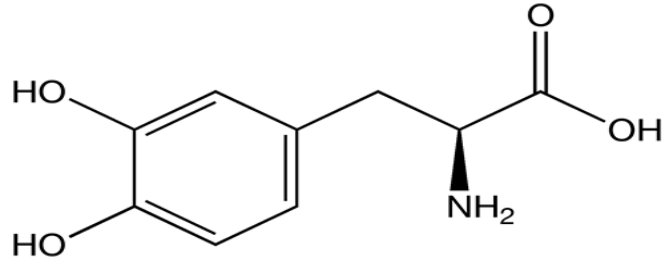
2.3.5. Kateşölün insan sağlığındaki risk özellikleri

İnsan sağlığı üzerindeki en önemli etkisi direkt olarak genetik materyale etki etmese de karsinojenik özellik göstermesidir. Fakat yapılan deneyler aslında çok anlamlı değildir. Yiyeceklerde bulunan, beslenmeyle alınan 1,2-benzendiöl insan sağlığı üzerinde risk teşkil etmezken, sanayi atıklarında ortaya çıkan 1,2-benzendiölün meydana getirdiği risk göz ardı edilemez. Kullanımı esnasında eldiven kullanılmalı ve mümkün olduğunca solunmamalıdır.

Yararlı bilgilere dayanarak 1,2-benzendiölün çevrenin biyolojik etkisinde uzun sürede zararlı etkisi görülmektedir. 1,2-benzendiole maruz kalındığında herhangi bir karsinojenik zarara rastlanabileceği kanıtlanmıştır (Screening Assessment for 1,2-Benzenediöl, 2008).

2.4 L-Dopa

L-Dopa olarak bilinen Levodopamin, IUPAC ismi (S)-2-amino-(3,4-dihidroksifenil) propanoik asittir. Molekül formülü C₉H₁₁NO₄ olan L-dopanin 197,19 gr/mol ağırlığına sahiptir. Kimyasal yapısı Şekil-2.3. de görülmektedir.



Şekil-2.3. : L-Dopanin kimyasal yapısı (<http://en.wikipedia.org/wiki/L-Dopa>).

L-3,4 dihidroksi fenilalanin olan L-Dopa yapısında açıkça görüldüğü gibi bir aminoasit türevidir. Levodopa ya da L-Dopa (3,4-dihidroksi-L-fenilalanin), dopamin biyosentezin de bir ara ürünüdür. Klinik olarak Parkinson hastalığının tedavisinde kullanılır. Ayrıca, denizcilikte yapıştırıcı olarak da kullanılır. (<http://en.wikipedia.org/wiki/L-Dopa>).

2.4.1. L-Dopanin teröpatik kullanımı

Levodopa: Parkinson hastalığının tedavisinde, dopamin seviyesini azaltan öncü ilaç olarak kullanılır. Levodopa; dopaminin geçemediği kan-beyin bariyerini geçebilir ve merkezi sinir sistemini geçtikten sonra aromatik L-aminoasit dekarboksilaz tarafından dopamine metabolize olur. Piridoksal fosfat (vitamin B6) bu dekarboksilasyon için kofaktördür.

Dopamine dönüşüm periferel dokularda olur (örneğin, beyin). Levodopanin ters etkisinin birincil mekanizmasıdır. Standart klinik uygulama için yardımcı yönetici bir periferel DOPA dekarboksilaz inhibitörü (carbidopa veya benzerazid) ve sık sık bir kateşol-o-metil transferaz (COMT) inhibitörü olarak periferel dokularda dopaminin sentezini önler. Ayrıca, levodopa 2005 yılından beri ‘huzursuz bacak sendromu’ tedavisinde de kullanılmaktadır.

2.4.2. L-Dopanin ters etkileri

Olası ters ilaç reaksiyonları içeriği; özellikle yüksek dozda yüksek tansiyon, nadiren Arrhythmias, Nausea ve Gastrointestinal kanama, huzursuz ve düzensiz solunum, saç kaybı, yüksek duygusal stres (özellikle endişe, aşırı libido), parlak rüyalar ya da parçalı uykular, görsel ve belki işitsel halüsinasyonlar, uykusuzluk ve uyku atakları, amfetamin piskoza benzer şartlar, çalışan hafızada gelişme, doz bitiminde hareketlerin kötüleşmesi, salınım, hareket esnasında donma, doz yetmezliği, aşırı dozda Dyskinesia (hareket bozuklukları).

2.4.3. L-Dopanin toksisitesi

Bazı çalışmalar Levodopa tedavisiyle birleştirilmiş ters etkilerin destek ve oluşumunda sitotoksik rol önermişlerdir. Bu ilaç genelde insan için önemlidir. Bazı araştırmacılar levodopa ile tedavi edilmiş fare fekromositoma PC12 hücrelerinde sitotoksikite belirleyicilerinde artış gözlemlemiştir. Başka bir toksik etkisi de; dopamine dönüşüm esnasında kinonların, oto-oksidasyonla artması ve orta beyine ait hücre kültürlerinde sonradan ortaya çıkan hücre ölümüdür. İntrasellüler ve nöral dokularda hastalık patojenazi için zararlı etkiler gösterse de Parkinson hastalığında ilaç olarak kullanımı sebebi ile L-Dopaya güvenli gözle bakılır.

2.6.4. L-Dopanin biyosentezi

L-dopa; trozin hidroksilaz enzimi tarafından trozin aminoasidinden üretilir. Ayrıca, katekolonin nörotransmitter dopamin, nörepinefrin ve hormon epinefrin için öncü moleküldür. Dopamin, L-Dopanin dekarboksilasyonu ile oluşur. L-Dopa, kateşol-o-metil transferaz (COMT) ile direkt olarak 3-o-metildopa (3-OMD) ve sonra vanilaktik aside (VLA) metabolize olur. Bu metabolik yol sağlıklı vücutta yoktur; fakat Parkinson'lu hastalarda ya da aromatik L-aminoasit dekarboksilaz enzimi eksikliği olan hastalarda periferik L-DOPA yöntemi sonrası önemlidir.

2.4.5. L-Dopanın tarihçesi

Ardvid Carlsson 2000 yılında hayvanlar üzerinde yaptığı deneylerle L-Dopanın Parkinson belirtilerini indirdiğini bularak Nobel ödülü almıştır. Nörolog Oliver Sacks bu tedavinin insan üzerinde olanına ‘Awakenings’ isimli kitabında yer vermiştir.

2001 yılındaki kimya dalı Nobel dördüncülük ödülünü L-Dopa ile ilgili çalışması ile William S. Knowles aldı.

2.4.6. L-Dopa içeren ilaveler

L-Dopa içeren ilaveler standart dozdadır ve reçetesiz kullanılabilir. Bu ilaveler internette ve Amerika’da oldukça popüler ve ulaşılabilir olmaktadır. En çok bilinen bitkisel kaynak bakla (*Mucuna pruriens*) tohumudur.

İki popüler üründen ‘DopaBean’, Solaray tarafından; ‘Mucuna’ ise, Physicia Formulas Inc. tarafından marketlere sunulmuştur. Bunlar kapsül halindedir. Bir kapsülün dozu 50 mg’dır ve günde iki kapsül kullanılması tavsiye edilir. Üçüncü ürün ‘L-Dopa Unique Nutrition’ tarafından piyasaya sunulmuştur ve daha yüksek olarak 250 mg’lıktır. Bir de America Nutrition NutraceuticalsRx etiketli % 40 ‘lık L-Dopa içeren ürünü vardır.

Bazı ortak iddialara göre bu ilaveler libidoyu ve büyüme hormonu seviyesini arttırmaktadır. Uzun zamanda bireysel sağlığı etkileyip etkilemeyeceği görülecektir.

2.4.6.1. Yapıştırma ve melanin oluşumu

Dopa; denizle ilgili yapıştırıcı proteinlerin formunda midyelerde olduğu gibi bir anahtar moleküldür. Su geçirmezlik ve hızlı polimerleşme özelliği olduğu sanılır. Dopa; kolay etkilenen alt tabaka yüzeylerinde, çürüme önleyici polimerlerin oluşturduğu tortuları önlemek için de kullanılabilir.

Melanin oluşumu:

Levodopa da onun öncü aminoasidi L-tirozinde biyolojik pigment olan melanin için öncü maddelerdir. Tirozinaz enzimi; L-Dopa'nın, reaktif ara ürün dopakinona oksidasyonunu katalizler ve bu reaksiyon, melanin oligomerine doğru ilerler (<http://en.wikipedia.org/wiki/L-Dopa>).

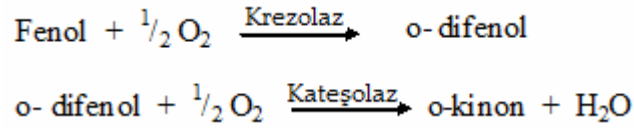
2.5. Polifenol oksidazlar (E.C.1.14.18.1)

Meyve ve sebzelerin endüstriyel hazırlanmaları sırasında gözlenen en önemli esmerleşmedir. Bu reaksiyona yol açan enzimler substratlarına bağlı olarak krezolaz, katekoloksidaz, katekolaz, polifenol oksidaz ve fenolaz olarak adlandırılır. 1981 yılından itibaren bunların tümü fenolazlar veya polifenol oksidazlar adı altında toplanmıştır. Bu enzimler, oksidoredüktazlar grubuna girer ve enzim terminolojisinde (E.C. 1.14.18.1, PPO) olarak belirtilir. Polifenoloksidazlar doğada hemen hemen tüm bitkilerde, bazı hayvansal dokularda ve birçok mikroorganizmada bulunur. Bitkilerdeki PPO miktarı; bitkinin türüne, yaşına, olgunluk durumuna ve yetiştirilmesine bağlıdır. Aynı zamanda bu enzimin bitki hücrelerinde bulunduğu yer her bitki türü için farklılık gösterir (Pekyardımcı, 1992).

Polifenol oksidazlar (monofenol, oksijen oksidoredüktaz) moleküler oksijeni kullanarak substratını dönüşüme uğratan oksidoredüktaz sınıfı bifonksiyonel enzimlerdir.

Polifenol oksidazlar (PPO) reaksiyonları iki adımda katalizlerler (Climent v.d.,2001).

1. Adım; monofenollerin o-difenollere o-hidroksilasyonu (krezolaz aktivitesi)
2. Adım; o-difenollerin o-kinonlara tamamen oksidasyonudur. (kateşolaz aktivitesi)



Meyvelerin, sebzelerin ve kabuklu deniz hayvanlarının endüstriyel hazırlanmaları sırasında, PPO nun katalitik etkisi sonucunda enzimatik kararmalara sebep olur. (Pekyardımcı, 1992). Polifenol aktivitesi sonucu oluşan o-kinonlar diğer bileşiklerle reaksiyon vererek renk koyulaşmasına ve istenmeyen lezzetlere sebep olurlar. Polifenol oksidazlar plastidlerde lokalize olmuştur, bunların fenolik substratları yoğun olarak vakuollerde bulunur. Bu nedenle subselüler kompartmanlanma bozulduğu zaman enzimatik kararma ortaya çıkar. Bu yüzden bitkisel ürünlerin toplanması ve depolanması sırasında bitkilerin mekanik bir etki (basınç, yaralanma, donma, preslenme v.b.) ile zarar görmemesi istenir (Chevalier v.d. , 1999).

Polifenol oksidazlar, her birim için bir bakır atomu içeren tetramer yapıları proteinlerdir ve fenolik substratlarını oluşturan aromatik bileşikler için bağlanma bölgesi vardır. Enzim 128.000 Dalton moleküler ağırlığa sahiptir (Climent v.d. , 2001).

Polifenol oksidazların aktivite için kofaktörlere ihtiyacı yoktur, ancak spektroskopik çalışmalar bakır içeren aktif bölgesinin varlığını göstermiştir. Bunun dışında grup spesifikliğı gösteren enzimlerdir ve bilinen tüm fenolik bileşikleri substrat olarak kullanırlar (Duran ve Espasito, 2000). Aktivite gösterdikleri optimum pH bölgesi 6,0-7,0 civarındadır (Climent v.d. , 2001). Ancak pH:4,5' un altında da aktivite gösterebilirler. pH:3,5' un altında polifenol oksidazların geri dönüşümsüz inaktivasyonu gerçekleşir. Optimum pH, genetik özellikler, fenolik substratların doğası ve enzimin ekstraksiyon metoduna bağlı olarak değişebilmektedir (Gomez-Lopez, 2002).

2.5.1. Polifenol oksidaz aktivitesi tayin yöntemi

Polifenol oksidaz aktivitesi tayin etmek için en çok kullanılan yöntem spektrofotometrik yöntemdir. Bugüne kadar yapılan çalışmaların genelinde spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır.

Spektroskopi, bir örnekteki atom, molekül veya iyonların, bir enerji düzeyinden diğerine geçişleri sırasında absorplanan veya yayılan elektromanyetik ışımının ölçülmesi ve yorumlanmasıdır. Her atom, molekül veya iyonun elektromanyetik ışıma ile kendine özgü bir ilişkisi vardır ve bunların dönme, titreşim ve elektronik enerjilerindeki değişiklikler spektroskopinin temelini oluşturur. Ayrıca, bir örneğin manyetik alana yerleştirilmesi ile oluşan enerji düzeyleri arasındaki geçişlerin ölçülmesi de bazı spektroskopik yöntemlerin temel ilkesidir (Yıldız v.d. , 1997).

2.5.2. Bulunduğu yerler ve önemi:

Polifenol oksidaz ve polifenoller bitkiler de yaygın olarak bulunmaktadır. Bunun dışında mikroorganizmalar da (birkaç bakteride, birçok küfte) özellikle mantarlarda bazı hayvansal organizmalarda da bulunabilir (Vamos-Vigyazo, 1981). Bazı kabuklu deniz hayvanlarında da (beyaz karides, küçük karides, Florida dikenli istakoz) bu enzimin varlığına rastlanmıştır (Chen v.d. , 1991).

Bitki hücresinde enzimin lokalizasyonu enzimin türüne, yaşına, sebze ve meyvelerde olgunluklarına bağlıdır (Vamos-Vigyazo, 1981).

Polifenol oksidazların sağlam bitki dokusundaki hücrelerin protoplazmalarında mitokondri ve kloroplast membranlarında lokalize olduğu, vakuollerdeki fenolik madde, organik asit ve tanenlerden etkilenmeden kendi fizyolojik görevini yaptığı belirlenmiştir (Walker, 1977; Vamos-Vigyazo, 1981). Ancak, doku dolayısıyla hücre herhangi bir dış etkenle parçalandığında, zedelendiğinde ya da aşırı olgunlaşma sonucunda polifenol oksidaz; substratları olan polifenoller ile etkileşip moleküler oksijen varlığında enzimatik esmerleşme süreci başlamaktadır. Bu olay birçok meyve ve sebzenin hasadından itibaren taşınması, depolanması ve tüketim için hazırlanması sırasında meydana gelmektedir. Bunun yanı sıra dondurarak saklama, konserve veya meyve suyu yapımı gibi teknolojik sistemlerin gereği olarak kesme, dilimleme, kabuk soyma, çekirdek çıkarma, parçalama-ezme ve çözme gibi teknolojik işlemlerde daha büyük boyutlar kazanmaktadır (Vamos-Vigyazo, 1981).

2.5.3. Substratları

Meyve ve sebzeler fenolik bileşiklerin geniş bir karışımını içerirler. Bununla beraber, bunların yalnızca küçük bir bölümü polifenol oksidaza substrat olması mümkündür. Enzimin en önemli doğal substratları kateşinler (- ve + epikateşin, + kateşin, kateşol, 4- metil kateşol), sinnamik asit esterleri (klorojenik asit, kafeik asit), 3,4-dihidroksifenil alanin (DOPA) ve tirozindir. Ancak, tirozin bulunduğu bütün bitkilerde polifenol oksidaz substratı değildir (Vamos-Vigyazo, 1981).

2.5.4. İnhibitörleri

Polifenol oksidaz kofaktör olarak bakır taşıyan bir metaloprotein olduğu için siyanür, karbonmonoksit, sodyumdietilditiokarbamat (DIECA), merkaptobenzotiazol, dimerkapto propanol, azid veya potasyum metil ksantat gibi metal şelat ajanları tarafından inhibe edilir. Bunların bazıları kinon formları ile de reaksiyona girerler. Benzoik asit, sinamik asit, p-kumarik asit, ferulik asit, m-kumarik asit, o-kumarik asit gibi bazı substitue sinamik asitler, borad, florit, azid gibi inorganik iyonlar, askorbik asit, sülfid, 2,3-naftalendiol, tioglikolat, potasyummetabisülfid, potasyumsüyanür, sodyum ve potasyum klorür, 2-merkapt etanol, 2-merkaptobenzotiazol, sistein, glutation, benzen sülfidik asit ve dietilditiokarbamat kullanılan inhibitörlerdendir (Vamos-Vigyazo, 1981).

2.6. Biyosensörlere Genel Bakış

Tüm canlılar yaşadıkları ortamdaki değişimleri derhal algılayıp yaşamlarını sürdürebilmek için değişimlere uymaya çalışırlar. İşte bu algılama mekanizması biyosensörlerin *in vitro* kullanımı için temel oluşturmuştur.

Canlılar teknologların hayal bile edemeyeceği duyarlık performansı gösterirler. Örneğin; bazı köpeklerin koku almaları insanlardan 100.000 kat daha duyarlıdır. Kelebekler partnerlerinin yaydığı birkaç molekülü hemen hissederler.

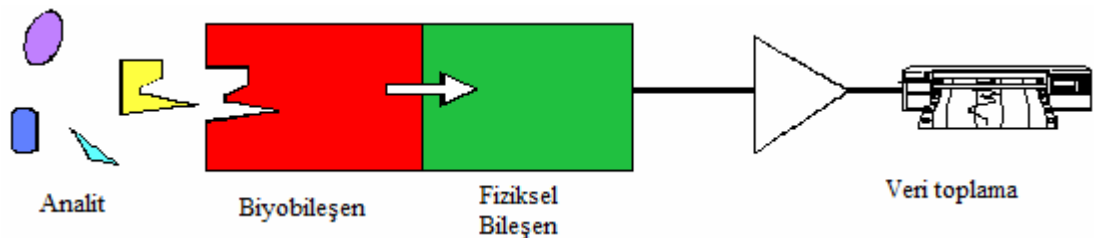
Canlılara bu uyarıları algılamayı mümkün kılan biyojik maddelerin analiz sistemleri ile birleştirilmesi biyosensörleri doğurmuştur. Biyosensörlerin tarihi 1950' li yılların ortalarında Amerika da bir hastanede (L.C. Clark' ın Cincinnati Hastanesi) ameliyat sırasında kanın O₂ miktarını bir elektrot ile izlemesiyle başlamış ve biyosensör teknolojisi hızla gelişmiştir.

Klasik elektrokimya ile sadece anyon ve katyonları belirleyen sensörler hazırlanabilirken sisteme biyomateriyalinde katılması ile diğer birçok maddenin tayini de mümkündür. Böylece hazırlanan analiz sistemlerine biyosensörler adı verilir (Telefoncu,1999).

2.6.1. Biyosensör ve biyosensör bileşenleri

Biyosensörler biyolojik tepkimelerde hedef analitleri denetlemek için kullanılan küçük algılayıcı cihazlardır. Birbiri içine geçmiş biri biyokimyasal diğeri elektrokimyasal özellikteki iki çeviriciden oluşmaktadır. Biyokimyasal kısmın görevi analiz edilecek maddeyle etkileşerek onu tanımadır. Bu tanıma olayının sonucunda bir biyokimyasal ürün de oluşabilmektedir. Biyosensörün ikinci kısmı olan elektrokimyasal kısım ise bu tanıma olayını okunabilir (ölçülebilir) bir sayısal değere çevirmekle görevlidir (Coulet, 1991; Turner, 1987).

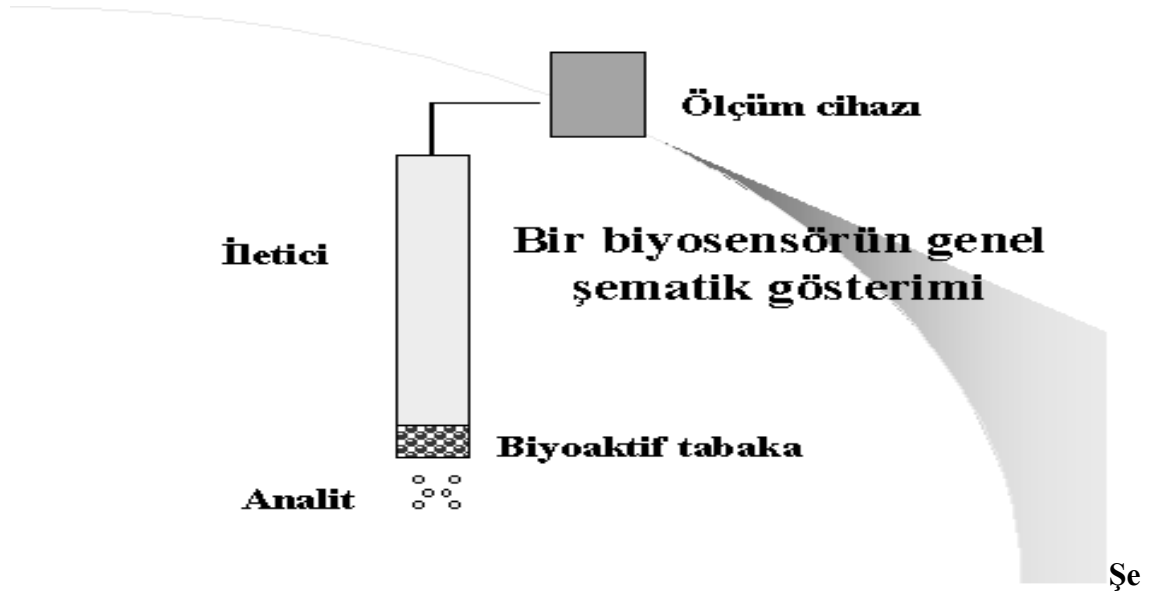
Şekil-2.4' de biyosensörlerin genel olarak çalışma prensibi gösterilmektedir.



Şekil-2.4. : Biyosensörlerin genel olarak çalışma prensibi

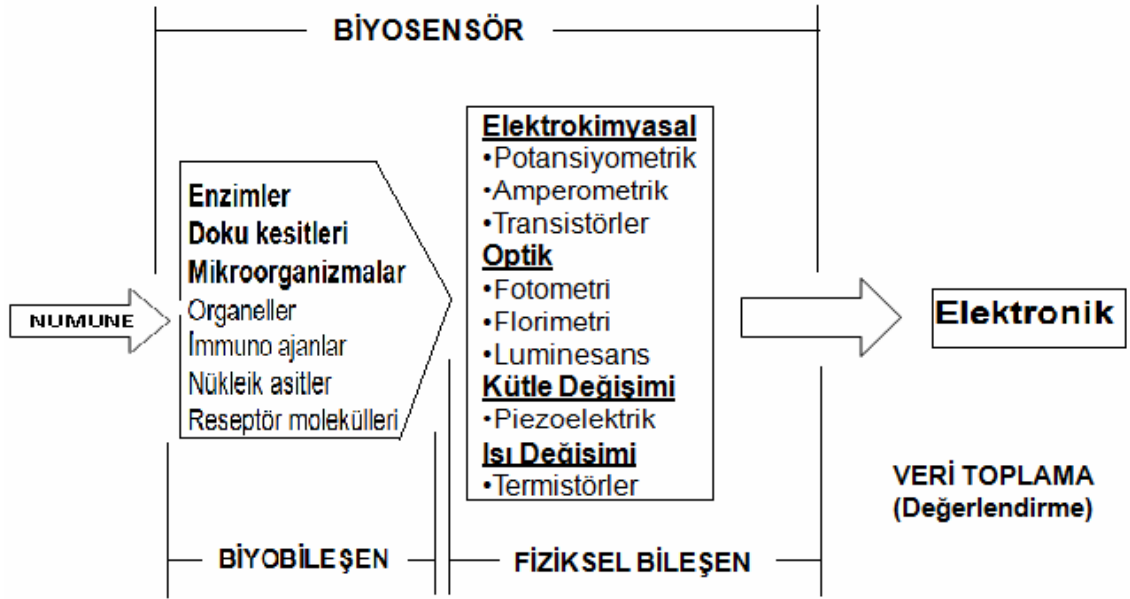
(sci.ege.edu.tr/~eubio/yaz_okulu/biyosensor.htm).

Biyosensörler, genel olarak analiz edilecek madde ile seçimli bir şekilde etkileşime giren biyoaktif bir bileşenin, bu etkileşim sonucu ortaya çıkan sinyali ileten bir iletici sistemle birleştirilmesi ve bunların bir ölçüm sisteminde kombinasyonu ile oluşturulurlar (Şekil-2.5.).



Şekil-2.5. : Biyosensörlerin şematik gösterimi (Telefoncu, 1999)

Biyosensörlerin ana görevi biyolojik bir olayın elektrik sinyaline dönüştürmesidir. Biyosensörler, biyobileşen (biyoreseptörler) ve fiziksel bileşen (transduserler) olmak üzere iki ana kısımdan oluşur. Biyosensörlerin genel olarak gösterimi ve çalışma prensibi aşağıdaki şekilde gibidir (Şekil-2.6.) (Telefoncu, 1999).



Şekil-2.6. : Biyosensörlerin yapısı ve Çalışma prensibi (Telefoncu, 1999).

2.6.2. Fiziksel bileşenler

Fiziksel bileşenler biyobileşenlerin biyolojik reaksiyonunu ölçebilir fiziksel bir sinyale dönüştürürler. Biyokimyasal reaksiyona göre fiziksel bileşen seçilir. Fiziksel bileşen (transduser) olarak kullanılan elektrotlar amperometrik ve potansiyometrik ölçümlerde kullanılır. Bunların dışında transistörler ve termistörlerde transduser olarak kullanılmaktadır. Biyosensörlerde, biyoaktif bileşenin tayin edilecek madde ile etkileştiğinde oluşan sinyalin iletim ve ölçümünde genel olarak; elektrokimyasal, optik kalorimetrik ve piezoelektrik esaslı sistemler kullanılır (Dinçkaya, 1999).

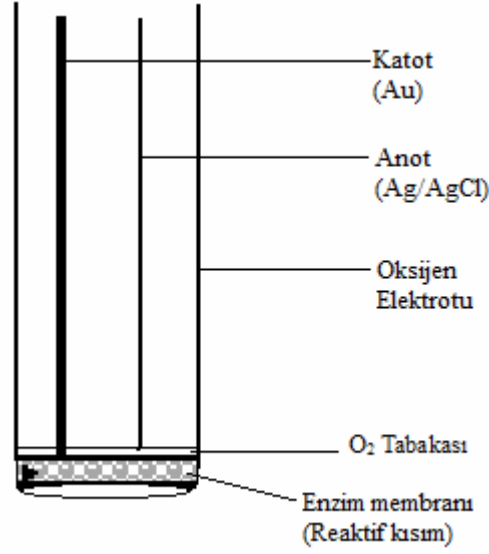
Tablo-2.2. : Fiziksel bileşen olarak kullanılan İletim Ve Ölçüm Sistemleri
(sci.ege.edu.tr/~eubio/yaz_okulu/biyosensor.htm).

İletim ve Ölçüm Sistemleri	
<u>Elektrokimyasal Esaslı</u>	<u>Kalorimetri Esaslı</u>
Amperometri Esaslı (Elektrotlar)	(Termistörler)
Potansiyometri Esaslı (Elektrotlar)	
Yarı İletken Esaslı (Transistörler)	<u>Piezoelektrik Esaslı</u> (Piezoelektrik Kristaller)
<u>Optik Esaslı</u>	
Fotometri Esaslı (Optik Lifler)	
Fluorometri Esaslı (Optik Lifler)	
Biyoluminesans Esaslı (Optik Lifler)	

Bu çalışmada polifenol oksidaz aktivitesi bakımından spektrofotometrik yöntemle taranan dokulardan hazırlanan biyosensörler iletim ve ölçüm sistemi bakımından elektrokimyasal esaslı amperometrik biyosensörlere girmektedir. Polifenol oksidaz, enzimleri oksijen varlığında substratın ürüne dönüşümünü katalizlediği için substratın bulunduğu ortamdaki çözünmüş oksijeni tüketerek yükseltgenirken biyosensör transduser vasıtası ile çözünmüş oksijen miktarı (mg/L) ölçer. Bu ölçüm Biyolojik Oksijen (BO) biyosensörü ile yapılır.

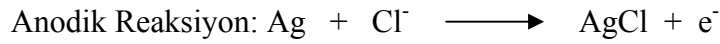
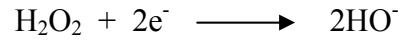
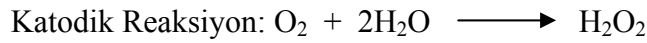
2.6.3. Biyolojik oksijen biyosensörü ve çalışma prensibi

Amperometrik temele dayalı çözünmüş oksijen problemleri, Au (Katot), Ag/AgCl (Anot), yarı doygun KCl (Elektrolit çözeltisi) ve oksijene duyarlı teflon bir membrandan oluşmuştur (Dinçkaya ve Telefoncu, 1993).

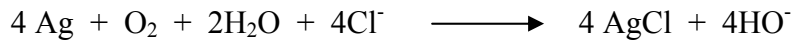


Şekil-2.7. : Oksijen probunun şeması (sci.ege.edu.tr/~eubio/yaz_okulu/biyosensor.htm).

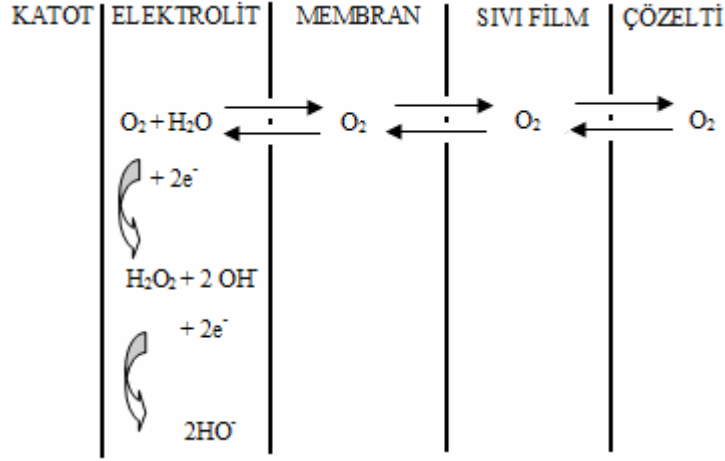
Membran gaz geçirgenliğinin yanı sıra sensörün dış çevreden korunmasına da olanak sağlar. Bu koruma reaksiyon ortamında olabilecek bir takım safsızlıklardan kaynaklanması muhtemel girişimlerin etkilerini en aza indirmektedir. (Dinçkaya, Akyılmaz ve Sezgintürk, 2003). İletici sistem olarak bir amperometrik sensörün kullanılması durumunda potansiyometrik sensörlerden en büyük fark ürünlerden sinyal oluşturan türün elektrot yüzeyinde tüketilmesidir (Dinçkaya, 1999).



Toplam Reaksiyon:



Şekil 2.8' de oksijenin reaksiyon ortamından katoda geçişi sırasındaki difüzyon basamakları verilmiştir.



Şekil-2.8. : Oksijenin reaksiyon ortamından katoda ulaşana kadar karşılaştığı difüzyon engellerinin şematik gösterimi (Akyılmaz, 1996).

2.6.4. Biyobileşenler

Biyosensörler de kullanılan ve analiz edilecek madde ile spesifik bir etkileşime giren biyoaktif bileşenlerdir. Biyosensörlerin yapısında görev alan biyobileşenler bazen de biyoreseptörler olarak da adlandırılırlar.

Biyobileşen olarak kullanılan enzim kaynakları içerisinde en yaygın olarak kullanılan saf enzimler, doku kesitleri ve mikroorganizmalardır.

Kullanım sıklığına göre biyobileşenler

- Enzimler
- Doku kesitleri
- Mikroorganizmalar
- Organeller
- İmmuno ajanlar
- Nükleik asitler ve Reseptör molekülleridir.

Biyobileşen olarak kullanılan enzim kaynakları içerisinde saf enzimler, doku kesitleri, mikroorganizmalar ve organeller biyokatalitik etkiye sahiptirler ve analiz

edilecek madde ile spesifik bir şekilde etkileşime girerek kimyasal bir reaksiyon sonucunda ürün oluştururlar. Oluşan ürünlerin değişimine göre de fiziksel bileşen seçilir ve ölçüm sağlanır.

Ancak, immüno ajanlar, nükleik asitler ve reseptör molekülleri ise biyospesifik etkiye sahiptirler ve analiz edilecek madde ile kimyasal bir reaksiyonla ürün oluşturmazlar. Fakat, bunlar analiz edilecek madde ile spesifik bir şekilde etkileşimi sonucunda birleşerek bağlanırlar. Daha sonra oluşan değişimin esasına göre de fiziksel bileşen seçilir ve ölçüm sağlanır (Telefoncu, 1999).

Tablo-2.3. : Biyobileşen olarak kullanılan enzim kaynaklarının birbirleri arasındaki avantaj ve dezavantajları.

KAYNAK	AVANTAJ	DEZAVANTAJ
<u>SAF ENZİMLER</u>	•Daha spesifiktir. •Difüzyon sorunu yoktur. •Daha hızlı analiz süresi •Kullanım miktarı azdır.	•Pahalıdır. •Aktivatör-Kofaktör gerektirir. •Kararlılığı düşük •İmmobilizasyon problemleri •Kullanım süresi kısa
<u>DOKU KESİTLERİ</u>	•Yüksek kararlılık •Yüksek aktivite •Düşük maliyet •Kullanım kolaylığı •Aktivatör-kofaktör gerektirmez. •Çoklu enzim sistemi kullanımı	•Difüzyon sorunu yoktur •Daha uzun analiz süresi •Mikroorganizma üremesine açık •Gaz geçirgenliği az
<u>MİKROORGANİZMALAR</u>	•Mekanik dayanıklılık yüksek •Hazırlama kolaylığı •Yüksek aktivite •Çoklu enzim sistemi •Hazırlanırken aktivite kaybı yok •Yüksek kararlılık •İstenilen yönde geliştirilebilme	•Difüzyon sorunu vardır. •Daha uzun analiz süresi •Gaz geçirgenlikleri az •Mikroorganizma sayısı optimize edilmeli

Saf olarak kullanılan enzimler; difüzyon sorunu olmaması, hızlı analiz süresi ve daha spesifik olmaları gibi avantajları varken kararlılıklarının düşük olması, aktivatör ve ko-faktör gerektirmeleri ve pahalı olmaları gibi de dezavantajları vardır. Biyobileşen olarak kullanılan doku kesitleri ve mikroorganizmaların kullanımında ise difüzyon sorunu olması, analiz süresinin uzun olması gibi dezavantajları varken; aktivatör ve ko-faktör gerektirmemeleri, yüksek aktivite ve kararlılık gibi de avantajları da vardır.

(Portaccio v.d. , 2006; Karakuş v.d. , 2005; Wu v.d. , 2007; Suman Singh v.d. , 2007; Sezgintürk v.d. , 2005; Kim, 2006; Abayomi v.d. , 2006; Timur v.d. , 2003; Srisawasdi v.d. , 2006) (Tablo-2.3)

Bu çalışmada amaç; bitkisel dokuların biyosensörlerde biyobileşen olarak kullanılabilirliği olduğundan, verilen biyobileşenler içinden yalnızca enzimler ve doku esaslı biyobileşenler ayrıntılı olarak açıklanacak diğer biyobileşenler açıklanmayacaktır. Bunlar hakkında bilgi, ilgili kaynaklarda bulunmaktadır.

2.6.5. Biyobileşenlerin immobilizasyonu

Uygun biyobileşen ve fiziksel bileşen (transduser) seçildikten sonra bunların birbirine bağlanması en önemli sorundur. Bu bağlanma işlemi biyobileşen immobilizasyonu olarak adlandırılır. Bu amaçla çok değişik yöntemler kullanılabilir. Hangi yöntemin kullanılacağı seçilen biyobileşen ve fiziksel bileşene göre belirlenir.

İmmobilizasyon hareketin sınırlandırılması işlemidir. Biyobileşen ile fiziksel ölçüm sisteminin birleştirilmesi için immobilizasyon yöntemleri kullanılır.

İmmobilizasyon, biyobileşenin kararlılığı ve tekrar kullanımı açısından büyük avantaj sağlar. Biyobileşenin immobilizasyonunda başlıca 5 yöntem kullanılır.

Bu yöntemler aşağıda kısaca açıklanmış ve Şekil-2.9 da gösterilmiştir.

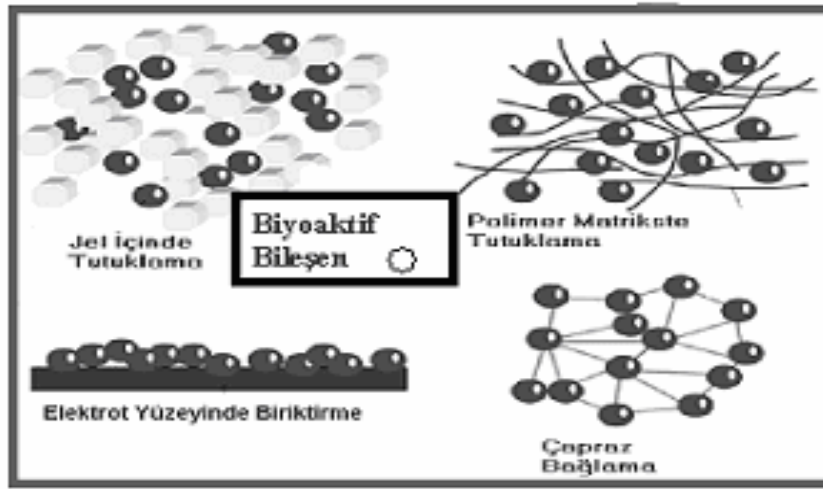
a)Kovalent bağlama: Biyobileşenin doğrudan fiziksel bileşen yüzeyine ya da önceden uygun bir film veya tabaka ile kaplanmış fiziksel bileşene kimyasal bir reaksiyon sonucu kovalent bağlanmasıdır.

b)Tutuklama: Biyosensörlerde biyobileşen olarak kullanılacak maddenin polimer jel matrixler de veya daha basit olarak diyaliz membranlarında tutuklanmasıdır.

c)Çapraz bağlama: Tutuklama yöntemiyle kimyasal bağlamanın birleştirilmiş şekli olarak uygulanır. Tutuklama ile hapsedilmiş biyobileşen glutaraldehit, hekza metilen, diizosiyanat veya diflorodinitrobenzen gibi bifonksiyonel reaktiflerle film veya tabakaya kovalent bağlanır.

d)Adsorbsiyon: immobilizasyonda kullanılan en eski ve en basit yöntemdir. Biyobileşenin film veya tabaka ile hidrofobik, hidrofilik veya iyonik etkileşim sonucu bağlanmasıdır.

e)Biyolojik bağlama: Biyobileşenin film veya tabakaya spesifik biyokimyasal bağlanma ile assosiasyonudur.



Şekil-2.9. : Biyobileşen hazırlanmasında en çok kullanılan immobilizasyon yöntemleri (sci.ege.edu.tr/~eubio/yaz_okulu/biyosensor.htm).

Biyosensörlerde en çok kullanılan immobilizasyon yöntemlerinden jel içinde tutuklama, polimer matrix de tutuklama ve elektrot yüzeyinde biriktirme yöntemleri fiziksel yöntemler sınıfına girerler. Ancak, çarpaz bağlama, adsorbsiyon ve kovalent bağlama immobilizasyon yöntemleri ise kimyasal yöntemler sınıfına girer. Çünkü biyobileşen olarak seçilen enzim kaynağı kimyasal bir reaksiyon sonucunda fiziksel bileşene bağlanır (Telefoncu, 1999).

2.6.6. Enzim biyosensörleri

Biyosensör teknolojisinin tarihsel gelişimine bakıldığında bu alandaki ilk çalışmaların enzim sensörleri ile başladığı görülmektedir. 1962’ de Clark ve Lyons ve

1967’ de Uptike ve Hick tarafından rapor edilen glukoz tayinine yönelik glukoz oksidaz enzim elektrotları bu konudaki ilk örnekleri oluşturmaktadır. Biyosensör teknolojisindeki ilk örnekler özellikle amperometrik ve potansiyometrik temelli enzim elektrotları şeklinde ortaya çıkmışlardır (Dinçkaya, 1999).

Temel bilimlerdeki ilerlemeler enzimlerin yanı sıra diğer biyolojik materyallerin fonksiyonlarının da çok daha ayrıntılı bir şekilde ortaya çıkarılmasına imkan verilmiştir. Bu ilerlemelerin doğal bir sonucu olarak farklı biyolojik materyallerin ve iletim sistemlerinin kombinasyonu ile çok çeşitli biyosensörler geliştirilmiş ve geliştirilmeye devam etmektedir. Bugün ki sonuca bakıldığında hangi temel iletim sistemi olursa olsun ki elektrokimyasal esaslı olanların tartışılmaz bir ağırlığı söz konusudur, pratik ve ticari uygulamalarda enzim elektrotlarının bir üstünlüğü göze çarpmaktadır. Bu sonuçtaki en büyük etmen canlı sistemlerle ilgili hemen hemen her türlü maddenin doğrudan veya dolaylı olarak analizinde kullanılacak binlerce enzimin varlığıdır. Bilinen enzimlerin yanı sıra bilinmeyenlerin potansiyel varlığı, piyasada yüzlerce enzim preparatının bulunabilirliği ve sayının her geçen gün yükselmesi enzim sensörlerinin tartışılmaz üstünlüğünden devam edileceğinin bir göstergesidir (Dinçkaya, 1999).

2.6.7 Doku biyosensörleri

1981’ de ilk defa bitki dokusu temelli elektrot hazırlanmasından itibaren, birçok bitki dokusu temelli biyosensör geliştirilmiştir. Bitki dokusu temelli biyosensörlerin bir çoğu; amperometrik elektrotlar, potansiyometrik transduserler ya da bu sistemlerin gaz-duyar elementler ile kombinasyonu sonucu oluşturulmaktadır (Baoxin, v.d. , 2002).

Bitki doku materyalleri kullanılarak oluşturulan biyosensörler, izole enzimlerle oluşturulan biyosensörlere bir alternatiftir (Sidwell ve Rechnitz, 1986). Hayvansal ve bitkisel dokuların organellerin kimi enzimlerce zengin olduğu bilinmektedir. İşte bu enzimlerin, izole edilmiş preparatların yerine doğrudan yoğun bulundukları bu kaynaklar, biyosensör hazırlanmasında kullanılır (Telefoncu, 1999). Doku biyosensörlerin de enzimin saflaştırılması gerekliliği ortadan kalkar, ayrıca doku biyosensörleri bazı enzimler için doğal ortamda artan kararlılık ve düşük maliyet gibi avantajlara sahiptirler (Macholan, 1987; Wang, Naser, 1991).

Doku kesitleri kullanıldığında biyosensörün cevap süresi genellikle uzundur. Bu süreyi kısaltmak için doku kesiti yerine bir havanda dokunun ezilmesi ile hazırlanan ve iyice homojenize edilen kısım kullanılır (Telefoncu, 1999).

2.6.8. Denemelerde taranan bitkisel doku örnekleri

Tezin başlangıcında spektrofotometrik yöntemle yapılan bitkisel doku taramalarında, aynı tür ve büyüklükteki; patlıcan, Trabzon hurması, muz kabukları (Anamur muzunun), lifli aloe vera, lifsiz aloe vera, kuru keçiboynuzu, kereviz, kaktüs, güvem, fasulye, enginar, bezelye, bakla, ayva, alabaş tohumu, alabaş sebzesi, yerelması ve genelde Trabzon yöresinde yetişen kokulu üzüm bitki doku örneklerinden yararlanılmıştır. Bu tarama sonucunda polifenol oksidaz enzim aktivitesi yüksek olan muz kabukları, yerelması ve bakla bitki dokularının biyosensörlere uygulanabilirliği araştırılmıştır.

2.6.8.1. Muz (*Musa Cavendish*)

Muz, Güneydoğu Asya'dan çıkmıştır. Anavatanı Güney Çin, Hindistan ve Hindistan ile Avustralya arasında kalan adalardır. Muzu ilk kültüre alanların balıkçılar olduğu sanılmaktadır. Balıkçılar ağ yapmak için muzun yapraklarından yararlanmışlar ve bu şekilde tarımı başlamıştır. Muzla ilgili ilk eser M.Ö. 600-500 yıllarına aittir ve Hindistan'da bulunmuştur. Muz bitkisi ülkemize ilk defa 1750 yıllarında Mısır'la ilgisi olan zengin bir aile tarafından süs bitkisi olarak, Mısır'dan Alanya'ya getirilmiştir. O yıllarda daha çok süs bitkisi olarak yetiştirilen Muzun meyve verdiğinin görülmesi üzerine, 1930'lu yıllardan sonra meyvesi için ticari amaçla yetiştirilmeye başlanmıştır. Bugün ülkemizde sadece Anamur, Bozyazı, Gazipaşa ve Alanya ilçeleri ile çevresinde *Musa Cavendish* dediğimiz bodur muz üretimi yapılmaktadır.

Dünya muz üretimi 1975 yılı istatistiklerine göre 37 milyon tondur. Ekiliş alanı ise 29.150.000 dekadır. Muz, ülkemizde 1994 de 12.000 dekar alanda 30.000 ton iken 2000 yılında 20.000 dekar alan ve 80.000 ton üretime ulaşmıştır. Ülkemizin yıllık muz tüketimi ise 400.000 ton civarındadır (<http://www.karanlar.com/>).



Şekil-2.10. : Muz ağacı ve meyvesinin genel görüntüsü (<http://www.1resimler.com-www.resimmotoru.com>).

Akdeniz bölgesinde yetiştirilen muz bitkisinin 40 türü ve 250 kadar çeşidi bulunmaktadır. 1-15 m. kadar boylanan, dallanmamış iri gövdeli, geniş yapraklı yukarıdaki şekilde görüldüğü gibi 1 yıllık otsu bir bitkidir.

Gerçek gövdesi soğan biçiminde ve toprağın altındadır. Yaprakların iç içe geçmiş kınları, toprak üstünde muzun "yalancı gövde"sini oluşturur. Yalancı gövdenin ortasından ve yaprak demetinin arasından çıkan çiçek topluluğu da bir demet oluşturur. Bu demetin dibinde önce beliren çiçekler dişi karakterdedir. Daha sonra demetin tepesinde erkek çiçekler ortaya çıkıp yere doğru eğilir. Dişi çiçeklerin tozlaşım olgunlaşmasıyla hevenk biçiminde meydana gelen meyve kümeleri, yukarı doğru dikilir.

Muz meyvesi taze olarak yenildiği gibi pastacılıkta, tatlıcılıkta ve dondurma yapımında kullanılır. Likörü de yapılır.

Muzun Besin Değerleri:

100 g soyulup dilimlenmiş taze muzun içerdiği besin değerleri şöyle sıralanabilir: 85 kilo kalori: 1,1 g protein; 22.2 g karbonhidrat; 0 kolesterol; 0,2 g yağ; 0,5 g lif; 26 mg fosfor; 8 mg kalsiyum; 0,7 mg demir; 1 mg sodyum; 370 mg potasyum; 33 mg magnezyum; 190 IU A vitamini; 0,05 mg B1 vitamini; 0,06 mg B2 vitamini; 0,7 mg B3 vitamini; 0,5 mg B6 vitamini; 7 mg C vitamini; 10 µg folik asit: 7 mg C vitamini ve 0,4 mg E vitamini (<http://www.sagliksayfam.com/besinler-ve-ozellikleri/muz.html>).

Muzun Sağlık Açısından Önemi:

Kolesterol düşürücü etkisi vardır. Zaman zaman enerji depolamak isteyen sporcular ve otomobil kullanırken yorulan sürücüler için ideal bir meyvedir. Ezilmiş olarak ishale karşı etkin bir meyvedir. Yüksek tansiyonu önler. Ülser yaralarını tedavi eder. İçerisindeki sodyum ve potasyum kalbi güçlendirir. Mutluluk hormonları Serotonin ve Salsolinol muz yiyenleri rahatlatır. Sporcular için "yasal doping maddesi" olarak da anılır. Besleyici özelliği sebebiyle bebek maması olarak kullanılmaya uygundur.

Bu tez çalışması sırasında Anamur muzunun iç kısmında ve kabuğunda PPO aktivitesi araştırıldı. Yapılan denemelerde kabuğunun PPO aktivitesi daha yüksek bulunmuştur.

2.6.8.2. Yerelması (*Helianthus tuberosus*)

Yeraltındaki yumruları ekim-nisan ayları arasında topraktan sökülerek kış sebzesi olarak yenilen Yerelması, Bileşikgiller familyasındandır. Anayurdu Amerika kıtası ve özellikle Kanada olan bu çok yıllık dayanıklı otsu bitki, 17. yüzyılda Avrupa'ya getirilmiş ve oradan dünyaya yayılmıştır. 1,5-2 m. kadar boylanabilen yerelması bitkisi ayçiçeğine benzer; ama yaprak ve çiçekleri daha küçüktür. Yazın açan sarıçiçekleri iri papatyaları andırır.



Şekil-2.11. : Yerelması bitkisinin genel görüntüsü (<http://bitkisel.mutlupartner.net>)



Şekil-2.12. : Yerelması bitkisinin çiçeği ve kökleri.

Bitkinin toprak üstü kesimleri hayvanlara yedirilir. Önemli olan, tadı biraz enginara benzeyen yumru kökleridir. Bej, kahverengi ya da bazen pembe-turuncu renkli olan bu yumrular, dış görünüş yönünden patatese benzer ancak patates kadar düzgün yapılı değildir. Yukarıdaki resimde toprak üstü kısmı, çiçeği ve yumru kökleri görülmektedir.

Yerelmasının Besin Değeri:

Yerelması yumruları, büyük oranda fuktoz polimeri inülin adlı madde ile meyve şekeri (fruktoz) içerir. Bu nedenle tatlı bir lezzeti vardır ve çok besleyicidir. Nişasta (glukoz polimeri) içermediğinden kalorisi çok düşüktür.

Yerelmasının Sağlık Açısından Önemi:

Emzikli annelerde süt gelişini artırır. İdrar söktürücüdür. Böbreklerin çalışmasını hızlandırır. Safra kesesini etkileyerek safra özsuyu gelişini artırır. Müşköl etkisi vardır. Cildi güzelleştirir. Cinsel gücü artırma (afrodizyak) etkisi bulunduğu ileri sürülmektedir. Bedenin direncini artırırken kan şekerini yükseltmediği için şeker hastalarına her zaman tavsiye edilen bir besindir (<http://www.sagliksayfam.com/besinler-ve-ozellikleri/yerelmasi.html>).

2.6.8.3. Bakla (*Vicia faba*)

İlkbaharın müjdecisi gibi pazara ve manavlara ilk gelen sebzelerden Bakla'yı veren, Baklagiller'in örnek bitkisidir. Anayurdu Avrupa ve Asya kıtaları olan baklanın,

5.000 yıl kadar önceleri Çin'de yetiştirildiği eski metinlerde görülmektedir. Ülkemizde de bol bol yetiştirilen ve tüketilen bakla, 60-100 cm. boylanabilen (bir yıllık) otsu bitkidir. Toprakta 1 m. kadar derine inebilen güçlü bir kök yapısı ile dört köşe kesitli içi boş gövdesi vardır.

Uygun koşullarda bitki, birkaç gövde birden oluşturup kardeşlenerek ürününü artırmayı sağlar. Bakla bitkisinin iki türlü yaprağı vardır: Asıl yaprakları yeşil renkli, oval biçimli ve bileşik bir sap üzerinde karşılıklı dizilidir. İkincil derecedeki beyazımsı yaprakları oval ya da mızrak biçimli olup kenarları dişlidir. Bunların üzerinde siyah renkli nektar bezleri bulunur.



Şekil-2.13. : Bakla bitkisi (www.bitkiseltedaviyontemleri.com).



Şekil-2.14. : Baklanın iç görüntüsü (www.kiriktabak.com).

Bitkinin erselik özellikler taşıyan çiçekleri beyaz renklidir. Ama üzerlerinde kırmızımtırak çizgiler ve morumsu veya siyah lekeler görülür. Kendi kendilerini

dölleyen bu çiçeklerden bitkinin bakla ya da badiç denilen meyveleri oluşur. Baklalar yeşilin çeşitli tonların dadır. Sapa yakın bölümünde siyah renkli bir külâh oluşur. Bu külâh, bakla çeşitlerine göre farklı olur. Baklanın içindeki taneler (bakla içi denilen çekirdekleri ya da bitkinin tohumları) de bakla çeşitlerine göre irilik, biçim ve sayı bakımından çeşitlilik gösterir.

Baklanın Besin Değerleri:

100g baklanın içerdği besin değerleri şunlardır: 45 kalori; 5 g protein; 6 g karbonhidrat; 0 kolesterol; 3 g yağ; 1,5 g lif; 22 mg fosfor; 20 mg kalsiyum; 0,4 mg demir; 85 mg sodyum; 110 mg potasyum; 150 IU A vitamini; 0,04 mg B1 vitamini; 0,03 mg B2 vitamini ve 4 mg C vitaminidir (<http://www.sagliksayfam.com/besinler-ve-ozellikleri/bakla.html>).

Baklanın Sağlık Açısından Önemi:

Bakla, baklagillerdeki tüm sebzeler gibi bedenin kansere yakalanma riskini azaltır. Bedenin kötü kolesterol düzeyini düşürür. Bakla içerdği insülinle kan şekerini düzene sokar. İçerdği yüksek orandaki lifle peklik (kabızlık) çekenlere iyi gelir. Bakla ayrıca, hemoroit ve diğer kalınbağırsak sorunlarında da sağlığa yararlı etkiler sağlar. Bütün bu sağlığımız için faydalı etkilerinden yararlanılmak üzere taze bakla ya da iç baklanın diyetimize katılması ve günlük olarak bir fincan dolusu baklanın yenmesi yeterli olacaktır (<http://www.uslanmam.com/ziraat-tarim/115092-bakla.html>).

Dikkat: Bakla, bu besine karşı duyarlı kişilerde bakla zehirlenmesine (favizm) yol açabilir. Bu duyarlılık kalıtsal olup böyle kişiler bakla yememelidir. Ayrıca, bu sebeple çok küçük çocuklara bakla yedirilmemesi önerilmektedir.

3. MATERİYAL VE METODLAR

3.1. Materyal

Polifenol oksidaz tayinine yönelik spektrofotometrik ölçümlerde, doku ekstratları hazırlanırken aynı tür ve boyuttaki muz kabuğu, yerelması, bakla, kokulu üzüm (Trabzon yöresinde yetişen kara üzüm), güvem, fasulye, bezelye, kurutulmuş kaktüs (kaynanadili yaprağı), kuru aloe vera (sarı sabır otu), alabaş tohumu ve alabaş sebzesi, kereviz, ayva, enginar, patlıcan, Trabzon hurması ve kuru keçiboynuzundan yararlanıldı ve bu bitki dokularının bazı özellikleri Tablo-3.1 de verilmiştir. Anamur muzunu ve Trabzon yöresinde yetişen kokulu üzüm (kara üzüm) hariç yararlanılan bitkisel dokuların hepsi Edirne Merkezdeki yerel pazardan temin edildi. Ayrıca, aloe vera (Sarısabır otu) ve kaktüs (Kaynanadili yaprağı) yaprağı da Didim-Aydın yöresinden temin edilmiştir.

Tablo-3.1. : Spektrofotometrede taranan bitki dokularının bazı özellikleri.

TÜRKÇE ADI	LATİNCE ADI	FAMİLYASI	KULLANILAN KISMI
Anamur muzunu	<i>Musa Cavendish</i>	<i>Musaceae</i> (Muzgiller)	Kabukları
Bakla	<i>Vicia faba</i>	<i>Baklagiller</i> (Fabaceae)	Tamamı
Yerelması	<i>Helianthus tuberosus</i>	<i>Bileşikgiller</i>	(Yumru) Kökleri
Trabzon Hurması	<i>Diospyros kaki</i>	<i>Ebenaceae</i>	Olgun Meyvesi
Patlıcan	<i>Solanum melongena</i>	<i>Patlıcangiller</i> (Solanaceae)	Olgun sebzesi
Sarı Sabır (Öd Ağacı)	<i>Aloe Ferox</i> (<i>Aloe Barbadensis</i>)	<i>Liliaceae</i> (Zambakgiller)	Kurutulmuş yaprakları
Keçiboynuzu	<i>Ceratonia siliqua</i>	<i>Baklagiller</i> (Fabaceae)	Olgun Meyvesi
Kereviz	<i>Apium graveolens</i>	<i>Maydanozgiller</i> (Apiaceae)	Ayrılmış olgun sebzesi
Kaynanadili yaprağı (hint inciri)	<i>Opuntia vulgaris</i> (<i>Leucobrycha</i>)	<i>Atlasçiçeği giller</i>	Olgun Yaprakları
Güvem (çakaleriği)	<i>Prunus spinosa</i>	<i>Çamgiller-Pinaceae</i>	Olgun Meyvesi
fasulye (yeşil)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>baklagiller</i> (fabaceae)	Olgun Sebzesi
Alabaş tohumu	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>gongylodes</i> L.	<i>Lahanagiller</i>	Tohumu
Alabaş Sebzesi	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>gongylodes</i> L.	<i>Lahanagiller</i>	Olgun Sebzesi
Enginar	<i>Cynara scolymus</i>	<i>Bileşikgillerden</i> (<i>Bileşik çiçekliler</i>)	Temizlenmiş olgun sebzesi
Trabzon kokulu üzümü	<i>Vitis labrusca</i> (<i>Isabella</i>)	<i>Vitaceae</i>	Olgun Meyvesi
Ayva	<i>Cydonia oblonga</i> (<i>C. vulgaris</i>)	<i>Rosaceae</i> (Gül giller)	Olgun Meyvesi
Bezelye	<i>Pisum sativum</i>	<i>Baklagiller</i> (Fabaceae)	Olgun Sebzesi

Kateşol ve L-Dopa tayinine yönelik doku homojenatı biyosensörleri hazırlanırken; (spektrofotometredeki sonuçlardan sonra) spektrofotometrik ölçüm sonucunda polifenol oksidaz aktivitesi yüksek olan muz, yerelması ve bakladan dokularından yararlanıldı.

Deneşler kullanılan cihazlar ve kimyasallar:

Cihazlar:

Deneşlerde kullanılan alet ve cihazların tümü Tablo-3.2 de verilmiştir.

Tablo 3.2. : Deneşlerde kullanılan araç ve gereçler.

ARAÇ-GEREÇLER
RAY LEIGHT UV-1600 marka Spektrofotometre
THERMO ORION 3 Star marka Oksijenmetre
THERMO ORION 081010 MD Çözünmüş Oksijen Probu
NUVE- BM-302 marka Sürkülasyonlu Su Banyosu
WTW pH 330İ marka pH metre
MSE MISTRAL 2000 Marka Santifirüj
CHILTERN SCIENTIFIC marka ısıtıcı ve karıştırıcı
GEC AVERY VA124-1AA2M13AAE (120 g) analitik terazi
KÖTTERMANN-1032 destile su cihazı
EPENDORF mikropipet takımı
ARÇELİK marka buzdolabı

Kimyasallar:

Çalışmanın deneşsel kısımlarında kullanılan kimyasallar aşağıda Tablo-3.3 de verilmiştir.

Tablo 3.3. : Deneylerde kullanılan kimyasallar ve markaları.

KULLANILAN KİMYASALLAR	
Kimyasalın Adı	Temin Edilen Kaynak
• Na₂HPO₄.12H₂O • KH₂PO₄ • GLUTER ALDEHİT (% 25 lik) • KATEŞOL	MERCK
• L-DOPA • JELATİN (225 BLOM)	SIGMA

3.2. Hazırlanan Çözeltiler

3.2.1. Spektrofotometre denemelerinde kullanılan çözeltiler

20 mM pH:7,0 Fosfat Tamponu: 7,96 g Na₂HPO₄.12H₂O dan alındı ve balon jojede 1 litreye (çözelti-1) tamamlandı. 1,511 g KH₂PO₄ den alındı ve balon jojede 500 mL ye (çözelti-2) tamamlandı. Hazırlanan çözelti-1 den 600 mL, çözelti-2 den 400 mL alındı ve karıştırıldı. pH-metre ile kontrol edilerek pH:7,0 ye ayarlandı.

0,02 M L-Dopa Çözeltisi: 0,39438 g L-Dopa alındı ve balon jojede 20mM pH:7,0 Fosfat tamponu ile 100 mL ye tamamlandı.

0,02 M Kateşol Çözeltisi: 0,22 g kateşol alındı ve balon jojede 20mM pH:7,0 Fosfat tamponu ile 100 mL ye tamamlandı.

3.2.2. Biyosensör denemelerinde kullanılan çözeltiler

50 mM pH:7,5 Fosfat Tamponu: 17,901 g Na₂HPO₄.12H₂O dan alındı ve balon jojede 1 litreye (çözelti-1) tamamlandı. 1,7005 g KH₂PO₄ den alındı ve balon jojede 500 mL ye (çözelti-2) tamamlandı. Hazırlanan çözelti-1 den 850 mL, çözelti-2 den 150 mL alındı ve karıştırıldı. pH-metre ile kontrol edilerek pH:7,5 e ayarlandı.

75x10⁻⁵ M L-Dopa Çözeltisi: 1,48 g L-Dopa alındı ve balon jojede 50mM pH:7,5 Fosfat tamponu ile 100 mL ye tamamlandı. Bu çözeltiden de 1 mL alındı ve balon jojede 100 mL ye 50mM pH:7,5 Fosfat tamponu ile tamamlandı.

15x10⁻⁵ M L-Dopa Çözeltisi: 0,296 g L-Dopa alındı ve balon jojede 50mM pH:7,5 Fosfat tamponu ile 100 mL ye tamamlandı. Bu çözeltiden de 1 mL alındı ve balon jojede 100 mL ye 50mM pH:7,5 Fosfat tamponu ile tamamlandı.

0,03 M Kateşol Çözeltisi: 0,33 g kateşol alındı ve balon jojede 50mM pH:7,5 Fosfat tamponu ile 100 mL ye tamamlandı.

0,006 M Kateşol Çözeltisi: 0,066 g kateşol alındı ve balon jojede 50mM pH:7,5 Fosfat tamponu ile 100 mL ye tamamlandı.

0,6 mM Kateşol Çözeltisi: 0,6607 g kateşol alındı ve balon jojede 100 mL ye 50mM pH:7,5 Fosfat tamponu ile tamamlandı. Bu çözeltiden de 1 mL alındı ve balon jojede 100 mL ye 50mM pH:7,5 Fosfat tamponu ile tamamlandı.

0,9 mM Kateşol Çözeltisi: 0,991 g kateşol alındı ve balon jojede 50mM pH:7,5 Fosfat tamponu ile 100 mL ye tamamlandı. Bu çözeltiden de 1 mL alındı ve balon jojede 100 mL ye 50mM pH:7,5 Fosfat tamponu ile tamamlandı.

2,4 mM Kateşol Çözeltisi: 2,64264 g g kateşol alındı ve balon jojede 50mM pH:7,5 Fosfat tamponu ile 100 L1 ye tamamlandı. Bu çözeltiden de 1 ml alındı ve balon jojede 100 mL ye 50mM pH:7,5 Fosfat tamponu ile tamamlandı.

% 2,5 luk Glutaraldehit Çözeltisi: % 25 Glutaraldehit çözeltisinden 10 mL alındı ve balon jojede 100 mL ye 50mM pH:7,5 Fosfat tamponu ile tamamlandı.

3.3 Metotlar

3.3.1.1. Ham enzim çözeltilerinin hazırlanması

Spektrofotometre de ölçülmek üzere aynı tür ve büyüklükteki patlıcan, Trabzon hurması, muz kabukları (Anamur muzunun), lifli aloe vera, lifsiz aloe vera, kuru

keçiboynuzu, kereviz, kaktüs, güvem, fasulye, enginar, bezelye, bakla, ayva, alabaş tohumu, alabaş sebzesi, yerelması ve genelde Trabzon yöresinde yetişen kokulu üzümünden hazırlanmış olan ham enzim çözeltilerinin her biri için aynı prosedür kullanılmıştır. Kullanılmış olan prosedür Tablo-3.4 de verilmiştir.

Tablo-3.4. : Enzim çözeltilerinin hazırlanması.

İşlem Sırası	İşlem
1	20 g bitki dokusu alınır ve havanda iyice ezilerek üzerine 20 mL 0,02M pH:7 Fosfat tamponu ilave edilir. Ancak, bu işlem +4 °C de yada buzda soğukta gerçekleştirilir.
2	Karışım, Nuche erlenmayeri ile nuche süzgecinde komprasör yardımı ile yada su trompu ile süzüntü katı kısımdan ayrılır.
3	Süzüntü, 4500 rpm de 1 saat santifirüjlenir. <u>Not:</u> santifirüjdeki tüplerin üstü parafilm ile hava alamayacak şekilde kapatılmalıdır.
4	Santifirüjden alınan tüplerin içindeki süzüntü süzgeç kağıdından süzülür ve şişelenir.

3.3.1.2. Spektrofotometre ile enzim aktivitesi tayin yöntemi

Örnek küvet 5 mL olacak şekilde; (0.01, 0.1, 0.2, 0.5 ve 1 mL olacak şekilde) enzim çözeltisi, 1 mL 0.02M Kateşol (0.02M pH:7.0 Fosfat tamponunda hazırlandı) çözeltisi ve ilave edilen enzim çözeltisine göre (sırası ile 3.99, 3.9, 3.8, 3.5 ve 3 mL olacak şekilde) 0.02M pH:7.0 Fosfat tamponu içerdi.

Referans küvet; 1 mL 0.02M Kateşol çözeltisi ve 4.00 mL 0.02M pH:7.0 Fosfat tamponu içerdi. 10 dakika boyunca her 1 dakikadaki absorbans artışları kaydedildi. Ölçümler 20 °C de 420 nm dalga boyunda yapıldı. Aktivite birimi olarak 1 dakikadaki 0.001 absorbans artışına sebep olan enzim miktarı olarak tanımlandı. (Yağar, 1994).

Enzimin substrat ile muamelesi sonucunda oluşan enzimatik reaksiyonun ilk 10 dakikasındaki 420 nm de okunan absorbans değerleri alındı. Ancak reaksiyonların ilk 3

dakikada tamamlandığı anlaşıldığından reaksiyon süresi olarak ortalama ilk 3 dakika alındı. Hesaplamalarda aşağıdaki formüller kullanılmıştır.

$$U = \frac{1}{\epsilon d} \Delta A / \text{dak.}$$

$$\text{Hacimsel Aktivite (U / ml)} = \frac{1}{\epsilon d V} \Delta A / \text{dak.}$$

$$\text{Bağıl spesifik aktivite} = \frac{\text{hacimsel aktivite}}{\text{mg olarak ml deki protein}}$$

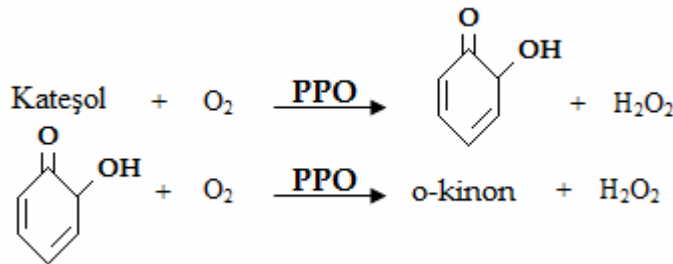
Burada;

U: Uluslararası enzim ünitesi
d: cm olarak küvet kalınlığı
ε : Molar absorpsiyon katsayısı (217,817)
ΔA /dak. : Dakikada absorbans değişimi
V: Kullanılan enzim hacmi

3.3.2.1. Doku homojenatı biyosensörlerinin hazırlanması

Doku biyosensörleri hazırlanırken; spektrofotometrik tarama sonucunda polifenol oksidaz aktivitesi yüksek olan yerelması, muz kabukları ve bakla dokuları kullanılmıştır.

Jelatin tabanlı doku homojenatı biyosensörünün hazırlanmasında kullanılan temel elektrot oksijen elektrotudur. Aşağıda verilen reaksiyonlar sonucunda gerçekleşen çözülmüş oksijen miktarındaki farkın doku homojenatı biyosensörü ile belirlenmesi mümkündür.



Bu sistemin oluşturulması ile oksijen elektrotu yüzeyi jelatin-doku homojenatı tabakasıyla kaplandı ve ardından glutaraldehit ile çapraz bağlanması gerçekleştirildi.

Yerelması, bakla ve muz kabuklarının, doku homojenatı kullanılarak hazırlanan jelatin tabanlı biyosensörlerin hazırlanmasında izlenen prosedür Tablo-3.5 de verilmiştir. Hazırlanan biyosensör ölçümler sonrası destile suyla yıkanır ve bir sonraki ölçüme kadar içerisinde destile su bulunan beherde +4 °C de saklanır. Bu işlemdeki amaç nemli ortam sağlayıp elektrotun kurumasını engellemektir.

Tablo-3.5 : Doku homojenatı kullanılarak jelatin tabanlı biyosensörlerin hazırlanması.

İşlem Sırası	İşlem
1	5 gr (150 mg bitki dokusu için 750 µL 50 mM pH:7,5 fosfat tamponu) bitki dokusu alınır üzerine 25 mL 50 mM pH:7,5 fosfat tamponundan eklenir ve porselen havanda homojenize edilir. Homojenize edildikten sonra karışımdan 900 µL ‘ şer homojenat alındı ve flakonlara koyuldu.
2	900 µL homojenat bulunan flakon içersine 20 mg jelatin koyulur ve 37,5 °C de 15 dk su banyosunda bekletilerek çözünür hale getirilir. Bu flakondan 200 µL homojenat çekilerek çözünmüş oksijen membranı yüzeyine yayılır.
3	+4 °C de (buzdolabında) 1 saat süreyle beklemeye bırakılır.
4	Bekleme süresinin sonunda buzdolabından alınarak % 2,5 luk glutaraldehit ile (50 mM pH:7,5 Fosfat tamponunda hazırlanmış) 5 dakika boyunca muamele edilir.
5	Glutaraldehit muamelesi sonrası biyosensör destile su ile yıkanır, daha sonra çalışma sıcaklığında ve 50mM pH:7,5 fosfat tamponunda bekletilir.

3.3.2.2. Doku homojenatı biyosensörleri ile ölçüm ilkesi

Doku homojenatı biyosensörlerinin hazırlanmasında oksijen elektrotunun dış yüzeyine biyoaktif tabaka monte edilmiştir. Enzimatik aktivite sonucunda çalışma koşullarında kateşolün, o-kinona oksidasyonu gerçekleşmektedir. Ölçüm hücresine substrat ilavesinin ardından enzimatik reaksiyonun başlamasıyla birlikte oksijenin

kullanımı ile çözülmüş oksijen miktarının farklı olmasına (azalmasına) neden olmaktadır.

Doku homojenatı biyosensörleri ile yapılan ölçümlerde kullanılan deney düzeneğinin resmi Şekil-3.1. de verilmiştir.



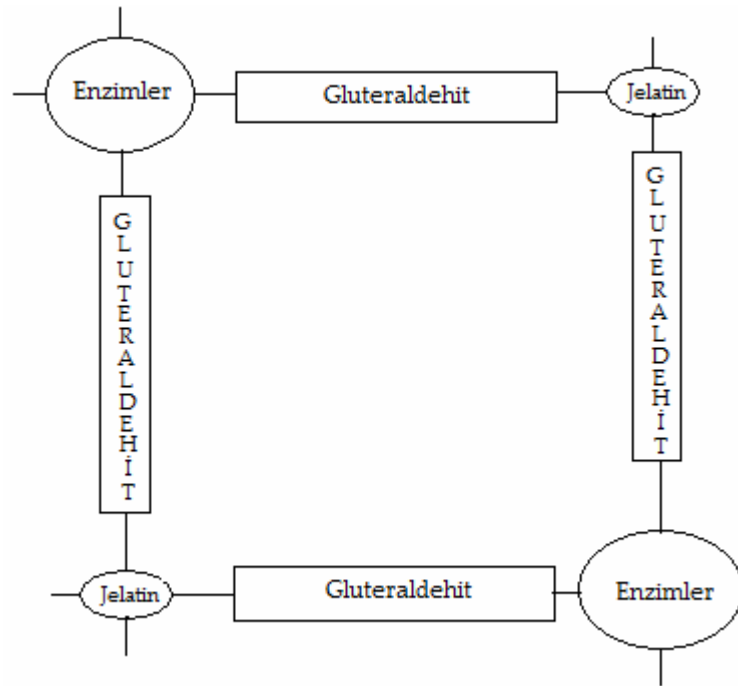
Şekil-3.1. : Doku homojenatı temelli biyosensörler ile ölçüm alınırken deney düzeneğinin ve kullanılan sürkölasyonlu su banyosunun resmi

Ölçüm yapılmadan önce biyosensör termostata bağlı reaksiyon hücresine alınarak ve manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak, çalışma tamponunda 37,5 °C sıcaklıkta 1 saat boyunca bekletilir. Daha sonra tampon değiştirilir. Substrat ilavesi öncesinde sistemin dengeye gelmesiyle (10 dakika) belirlenen çözülmüş oksijen miktarı değeri kaydedilir ve ardından substrat ilavesi yapılır. Oluşan enzimatik reaksiyon 10 dakikada tamamlanır ve yeni bir denge durumuna ulaşılır. Bu durumda oksijen metreden okunan oksijen miktarı, substrat yokluğuna kıyasla daha düşüktür. Deneysel çalışmalarda her iki denge durumunda okunan çözülmüş oksijen miktarının farkı alınır. Söz konusu farklanma, substrat konsantrasyonuyla orantılıdır.

Not: Her ölçümdeki toplam reaksiyon süresi 20 dakikadır. Bu sürenin ilk 10 dakikası sistemin dengeye gelmesi için beklenir ve bu süre sonunda çözülmüş oksijen miktarı kaydedilir. Sistem dengeye gelince substrat ilavesinde sonra 10 dakika

reaksiyon süresi hesaplanır ve bu süre sonunda da çözünmüş oksijen miktarı kaydedilir. İlk 10 dakikadaki çözünmüş oksijen miktarından, 10 dakikalık reaksiyon süresi sonundaki çözünmüş oksijen miktarı çıkarılır. Böylece enzimin oluşturduğu reaksiyon sonucunda harcanmış çözünmüş oksijen miktarı hesaplanmış olur.

Doku homojenatı biyosensörleri biyoaktif tabakalarının Şematik gösterimi Şekil-3.2. de verilmiştir.



Şekil-3.2. : Doku homojenatı biyosensörleri biyoaktif tabakalarının Şematik gösterimi (Sezgintürk, 2002).

3.3.2.3. Kateşol tayinini için doku biyosensörleri

Kateşol tayinine yönelik kullanılacak sistem için, spektrofotometrik tarama sonucunda PPO aktivitesi yüksek olan yerelması, muz kabukları ve bakla dokularından yola çıkarak çeşitli doku biyosensörleri hazırlandı. Değişen kateşol konsantrasyonuna karşılık bu biyosensörlerin cevapları karşılaştırıldı.

Kateşol tayinine yönelik hazırlanmış doku biyosensörlerinin hepsi (yerelması, muz kabukları ve bakla) daha önceden belirlenmiş optimum şartlar altında uygulandı.

150 mg bitki dokusu miktarı, 20 mg jelatin miktarı, %2,5 luk glutaraldehit, optimum pH:7.5, 50mM fosfat tamponu (pH:7,5 için) konsantrasyonu, sıcaklık olarak da 37.5 °C optimum şartlar olarak belirlendi. Ayrıca, L-Dopa tayinine yönelik hazırlanan bakla biyosensörü ile de aynı şartlar altında çalışılmıştır.

3.3.2.4. Doku biyosensörlerinin karakterizasyonları

Ölçüm aralığı

Kateşol tayini için hazırlanan biyosensörlerin karakterizasyonlarını belirlemek amacıyla; hazırlanan her biyosensör için ayrı ayrı standart grafikler (yerelması, muz kabukları ve bakla için ayrı ayrı) çizilerek, ölçüm aralıkları belirlendi. Belirlenen ölçüm aralıkları; Fosfat tamponunda (pH:7,5; 50 mM) ve 37,5 °C de gerçekleştirildi.

Analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği

Bu çalışmalarda belirlenen ölçümler, Fosfat tamponunda (pH:7,5; 50 mM) ve 37,5 °C de gerçekleştirildi.

Yerelması için, Fosfat tamponunda (pH:7,5; 50 mM) ve 37,5 °C de gerçekleştirilen denemelerde 8 µM kateşol içeren standart kullanılarak 6 deneme yapıldı. Ölçümlere ilişkin standart sapma ve varyasyon katsayısı belirlendi.

Muz kabukları için, Fosfat tamponunda (pH:7,5; 50 mM) ve 37,5 °C de gerçekleştirilen denemelerde 25 µM kateşol içeren standart kullanılarak 6 deneme yapıldı. Ölçümlere ilişkin standart sapma ve varyasyon katsayısı belirlendi.

Bakla için, Fosfat tamponunda (pH:7,5; 50 mM) ve 37,5 °C de gerçekleştirilen denemelerde 50 µM kateşol içeren standart kullanılarak 6 deneme yapıldı ve ayrıca, aynı şartlar altında 3 µM L-dopa içeren standart kullanarak ise 6 deneme yapıldı. Ölçümlere ilişkin standart sapma ve varyasyon katsayısı belirlendi.

Operasyon kararlılığı

Yerelması, muz kabukları ve bakla doku biyosensörlerinin operasyon kararlılıklarını belirlemek amacıyla yeni hazırlanan biyosensörlerin aynı optimum şartlar altında her saat başında belirli kateşol standardı için ölçümler gerçekleştirildi.

37,5 °C de ve 50 mM pH:7,5 Fosfat tamponunda gerçekleştirilen denemelerde; muz doku homojenatı biyosensörü için 25 µM kateşol konsantrasyonunda, yerelması doku homojenatı biyosensörü için ise 8 µM kateşol konsantrasyonunda, bakla doku homojenatı biyosensörü için ise; 50 µM kateşol ve 3 µM L-dopa konsantrasyonlarında çalışıldı. Başlangıçta elde edilen biyosensör cevapları %100 kabul edilerek, 30 dakikada aralıklarla yapılan denemelerde elde edilen biyosensör cevapları kıyaslandı.

4. DENEYLER VE BULGULAR

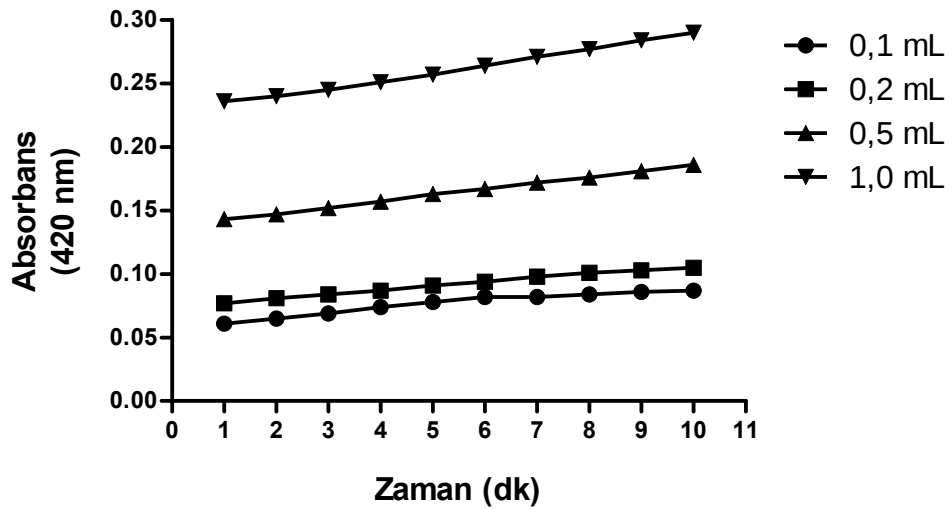
4.1. Dokulardaki PPO Aktivitelerinin Spektrofotometrik Ölçüm Bulguları

Biyosensörlere uygulanmak üzere polifenol aktivitesi yüksek olan bitkisel dokuları belirlemek için, hazırlanan bitki dokularının ham enzim ekstraktlarının spektrofotometrede kateşol substratı varlığında polifenol oksidaz aktiviteleri incelendi. İnceleme sonucunda, grafiklerden PPO aktivitesi yüksek olduğu görülen dokuların toplam protein miktarları ve spesifik aktiviteleri hesaplandı.

Her doku ekstraktı için spektrofotometrik tarama sonucunda elde edilen veriler yardımıyla hazırlanan grafikler aşağıda sırayla verilmiştir. Burada kullanılan her örnek için spektrofotometrik absorbans değerleri çok yer tuttuğu için; veri tabloları halinde **6.EKLER** bölümünde verilmiştir.

4.1.1. Trabzon siyah-kokulu üzümü

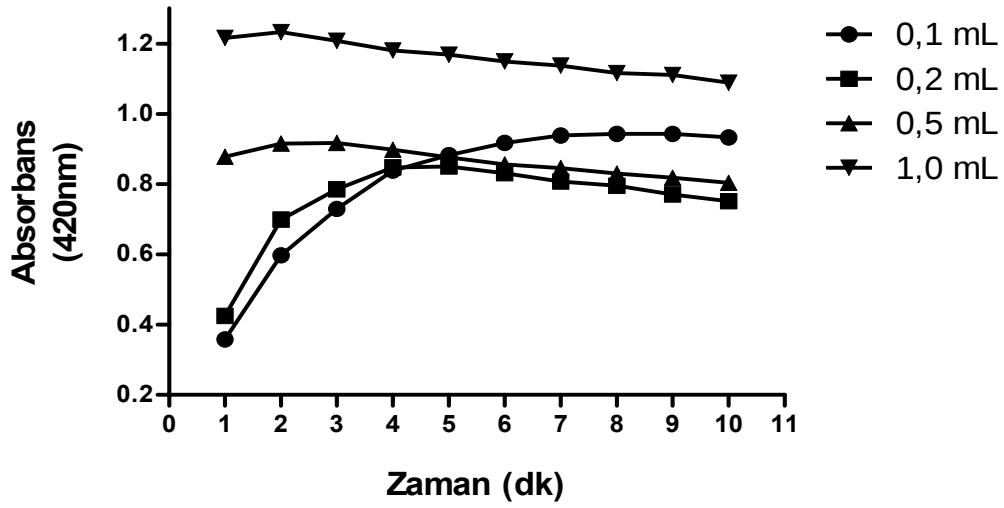
Üzüm ekstraktı miktarına bağlı olarak absorbans değişimleri Şekil-4.1 de görüldüğü gibi ekstrakt hacmi ile absorbans artışı doğru orantılıdır.



Şekil-4.1. : Trabzon kokulu üzümü (siyah üzüm) ekstraktının farklı hacimlerinin spektrofotometredeki absorbans değişimleri.

4.1.2. Yerelması

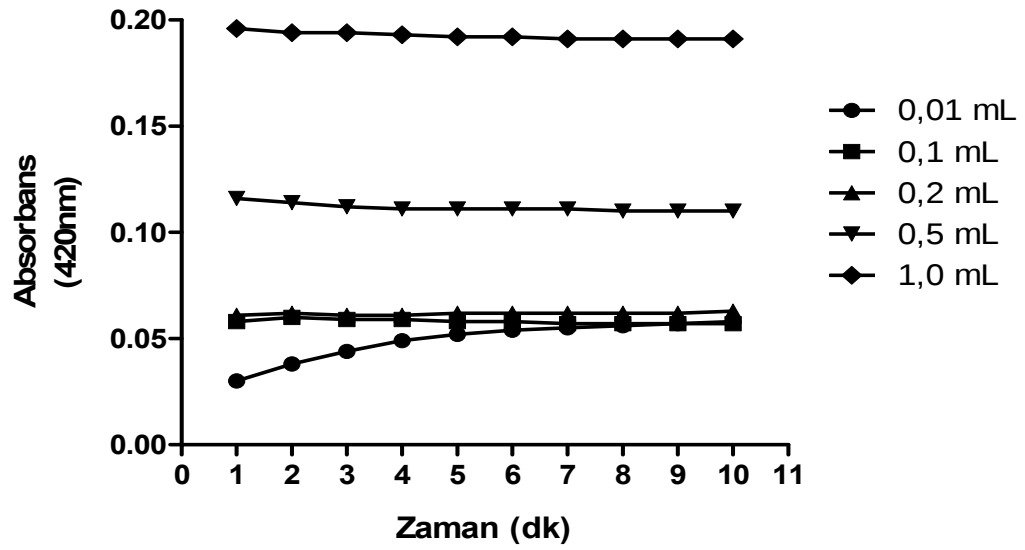
Yerelması köklerinin ekstraktı miktarına bağlı olarak absorbans değişimleri Şekil-4.2 de görüldüğü gibi ekstrakt hacmi ile absorbans artışı doğru orantılıdır. Ancak, 0,5 ml ve 1 ml ekstrakt hacimlerinin absorbans değerlerinde, ortamdaki substrat (kateşol) miktarı az gelmesi sebebiyle substrat hemen tükenip, reaksiyon geri dönüşümlü olmasından dolayı absorbanslarda düşüşe neden olmuştur.



Şekil-4.2. : Yerelması ekstraktının farklı hacimlerinin spektrofotometredeki absorbans değişimleri.

4.1.3. Alabaş sebzesi

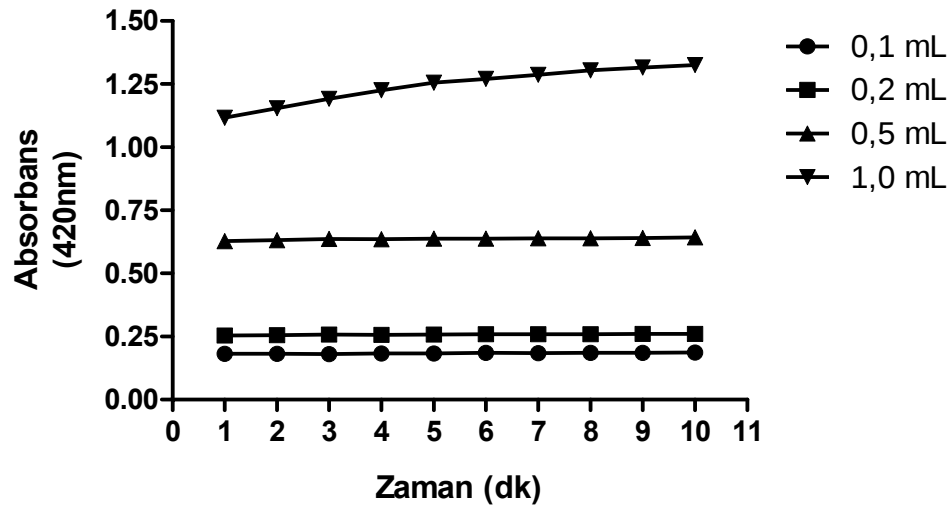
Alabaş sebzesi ekstraktı miktarına bağlı olarak absorbans değişimleri Şekil-4.3 de görüldüğü gibi ekstrakt hacmi ile absorbans artışı doğru orantılıdır.



Şekil-4.3. : Alabaş sebzesi ekstraktının farklı hacimlerinin spektrofotometredeki absorbans değişimleri.

4.1.4. Alabaş tohumu

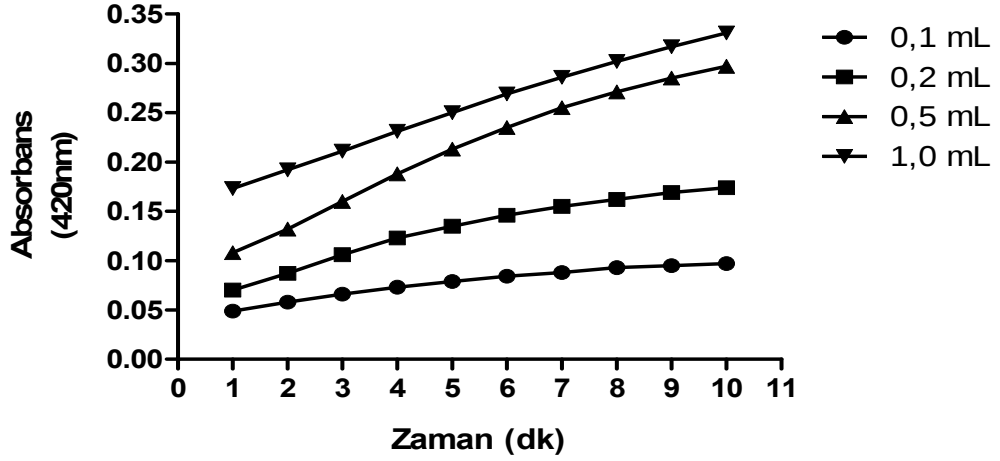
Alabaş tohumu ekstraktı miktarına bağlı olarak absorbans değişimleri Şekil-4.4 de görüldüğü gibi ekstrakt hacmi ile absorbans artışı doğru orantılıdır.



Şekil-4.4. : Alabaş tohumu ekstraktının farklı hacimlerinin spektrofotometredeki absorbans değişimleri.

4.1.5. Ayva

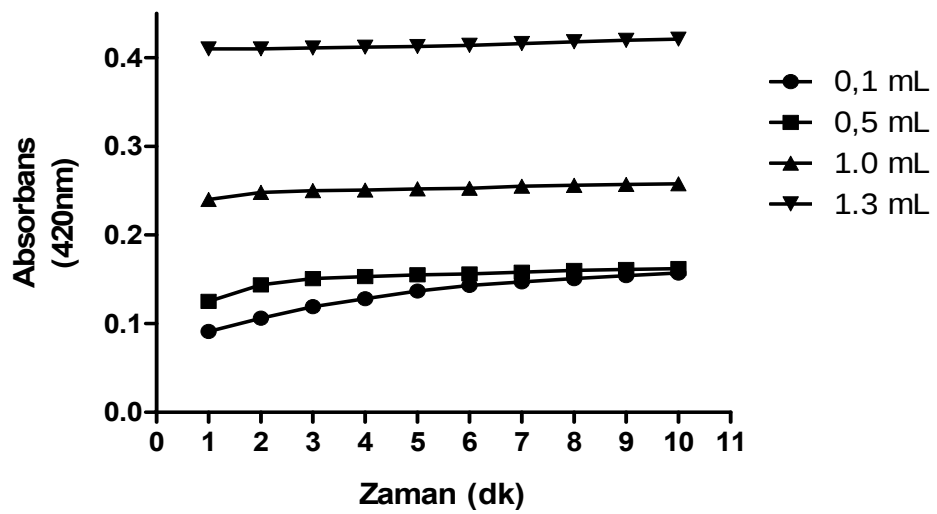
Ayva ekstraktı miktarına bağlı olarak absorbans değişimleri Şekil-4.5 de görüldüğü gibi ekstrakt hacmi ile absorbans artışı doğru orantılıdır.



Şekil-4.5. : Ayva ekstraktının farklı hacimlerinin spektrofotometredeki absorbans değişimleri.

4.1.6. Bakla

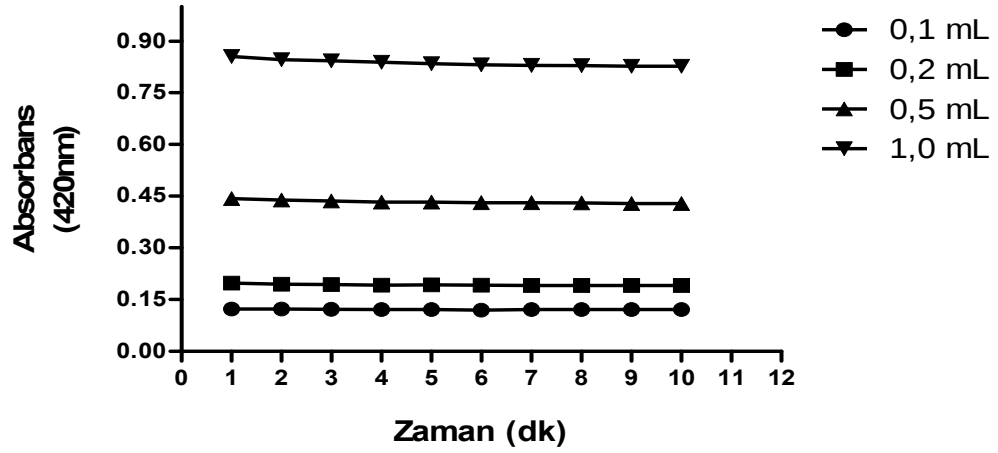
Bakla ekstraktı miktarına bağlı olarak absorbans değişimleri Şekil-4.6 da görüldüğü gibi ekstrakt hacmi ile absorbans artışı doğru orantılıdır.



Şekil-4.6. : Bakla ekstraktının farklı hacimlerinin spektrofotometredeki absorbans değişimleri.

4.1.7. Bezelye

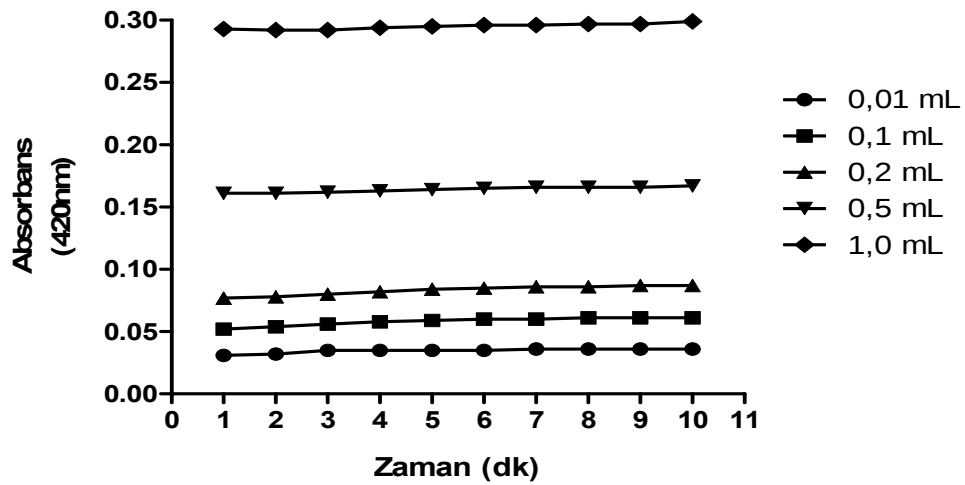
Bezelye ekstraktı miktarına bağlı olarak absorbans değişimleri Şekil-4.7 de verilmiştir.



Şekil-4.7. : Bezelye ekstraktının farklı hacimlerinin spektrofotometredeki absorbans değişimleri.

4.1.8. Enginar

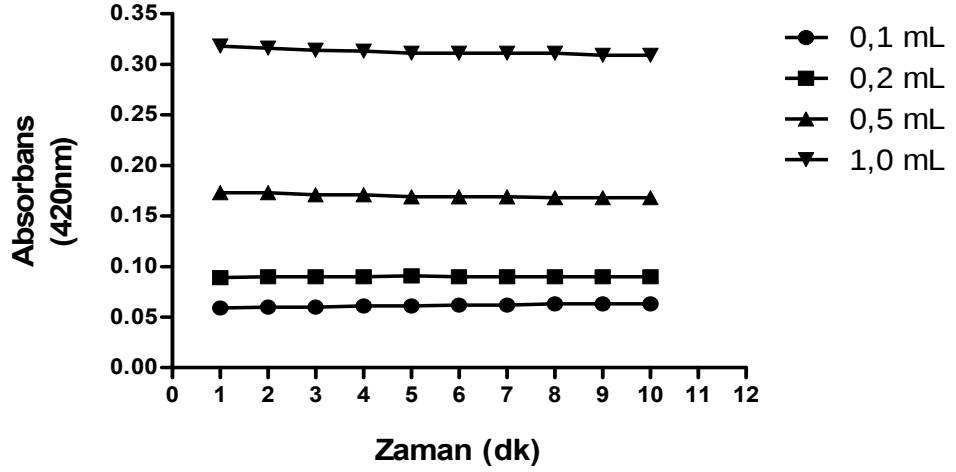
Enginar ekstraktı miktarına bağlı olarak absorbans değişimleri Şekil-4.8 de verilmiştir.



Şekil-4.8. : Enginar ekstraktının farklı hacimlerinin spektrofotometredeki absorbans değişimleri.

4.1.9. Fasulye (yeşil)

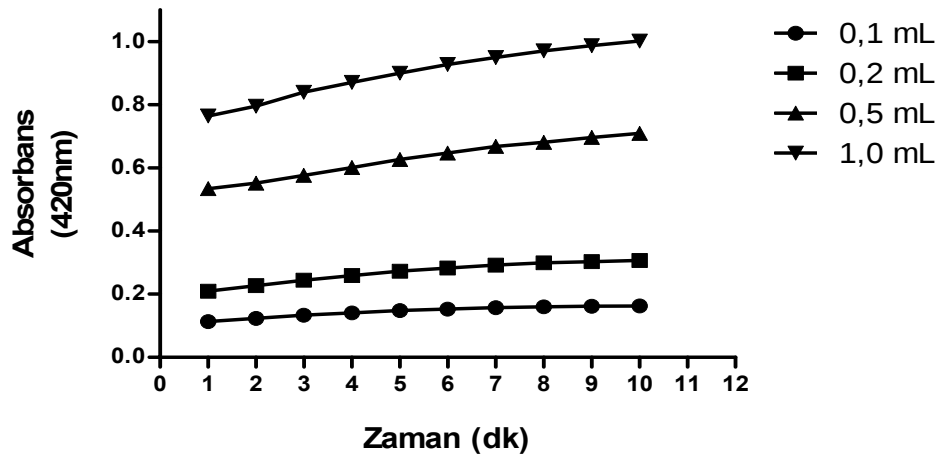
Fasulye ekstraktı miktarına bağlı olarak absorbans değişimleri Şekil-4.9 da verilmiştir.



Şekil-4.9. : Fasulye (yeşil) ekstraktının farklı hacimlerinin spektrofotometredeki absorbans değişimleri.

4.1.10. Güvem (barut ağacı)

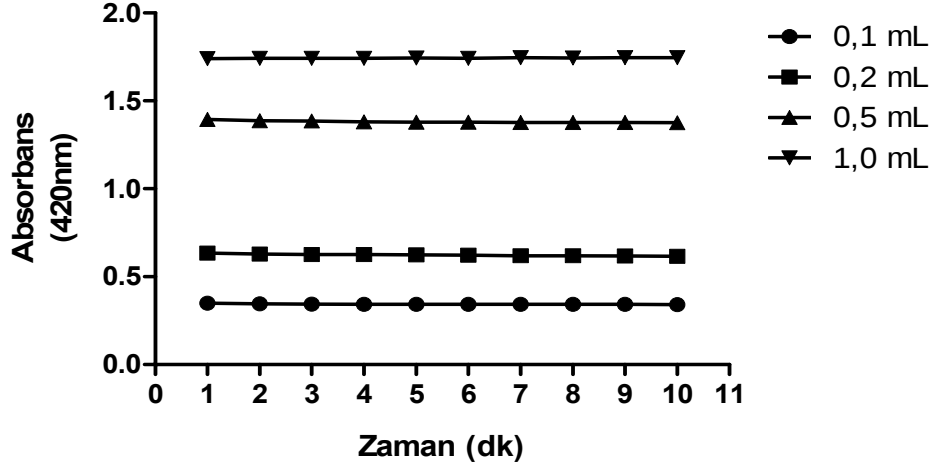
Güvem ekstraktı miktarına bağlı olarak absorbans değişimleri Şekil-4.10 da verilmiştir.



Şekil-4.10. : Güvem ekstraktının farklı hacimlerinin spektrofotometredeki absorbans değişimleri.

4.1.11. Kaktüs (kaynanadili yaprağı)

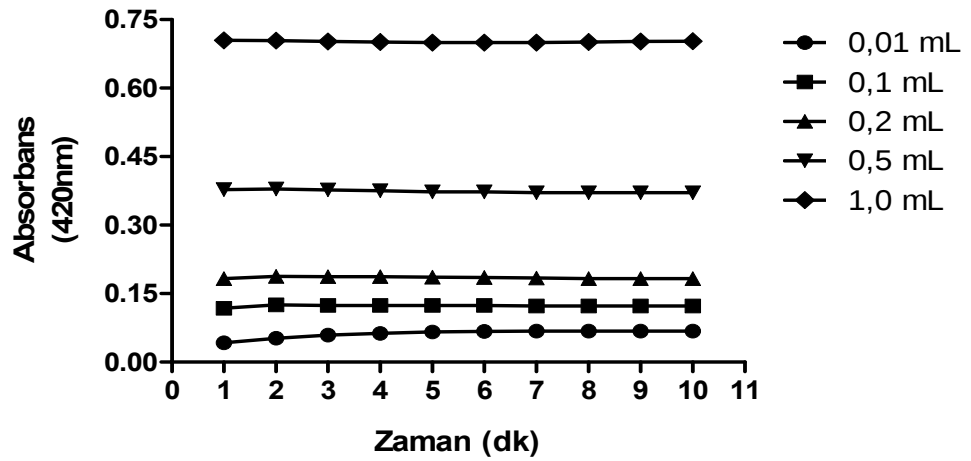
Kaktüs ekstraktı miktarına bağlı olarak absorbans değişimleri Şekil-4.11 de verilmiştir.



Şekil-4.11. : Kaktüs (kuru) ekstraktının farklı hacimlerinin spektrofotometredeki absorbans değişimleri.

4.1.12. Kereviz

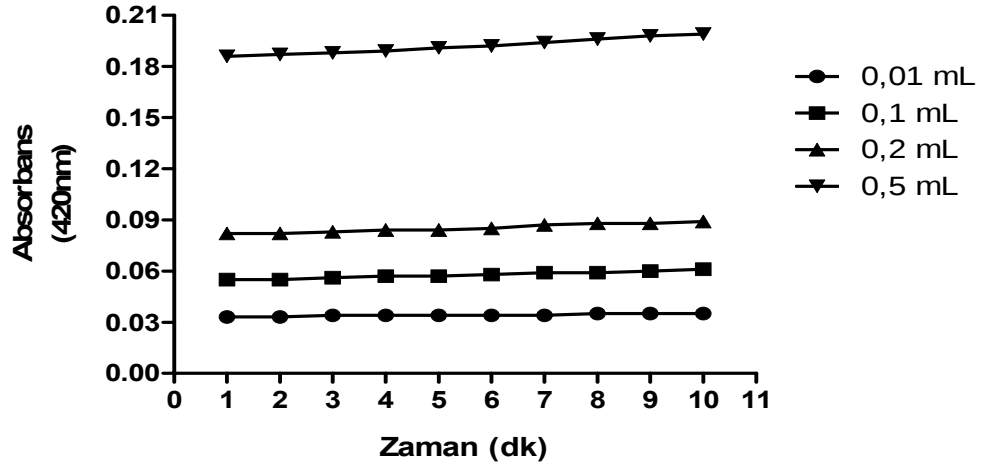
Kereviz ekstraktı miktarına bağlı olarak absorbans değişimleri Şekil-4.12 de verilmiştir.



Şekil-4.12. : Kereviz ekstraktının farklı hacimlerinin spektrofotometredeki absorbans değişimleri.

4.1.13. Keçiboynuzu (kuru)

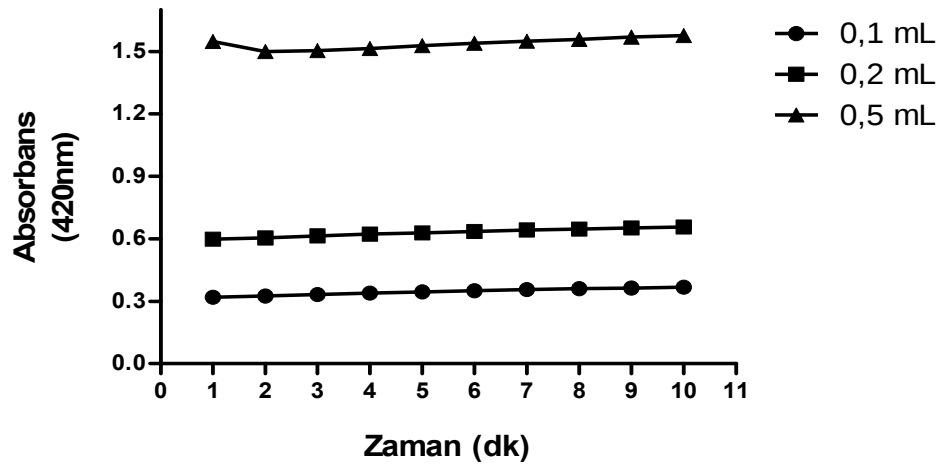
Keçiboynuzu (kuru) ekstraktı miktarına bağlı olarak absorbans değişimleri Şekil-4.13 de verilmiştir.



Şekil-4.13. : Keçiboynuzu (kuru) ekstraktının farklı hacimlerinin spektrofotometredeki absorbans değişimleri.

4.1.14. Lifli-kuru aloe vera (Sarısabır otu)

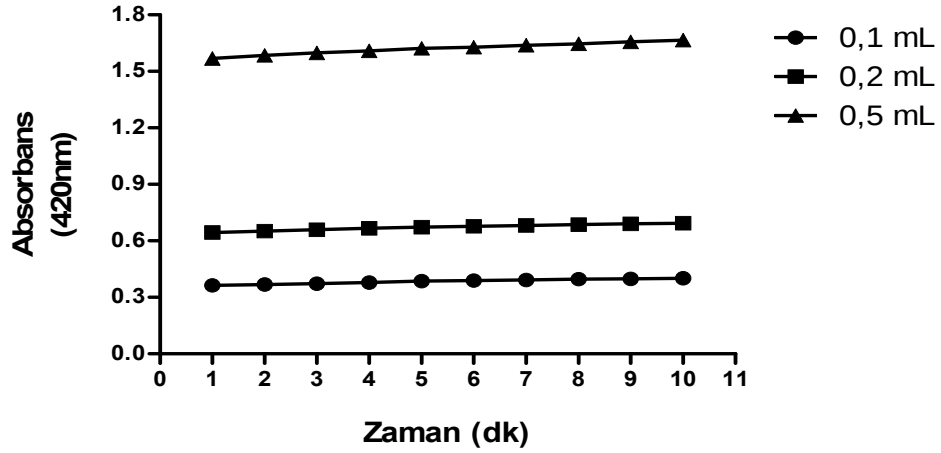
Lifli aloe vera (kuru) ekstraktı miktarına bağlı olarak absorbans değişimleri Şekil-4.14 de verilmiştir.



Şekil-4.14. : Aloe vera (kuru-lifli) ekstraktının farklı hacimlerinin spektrofotometredeki absorbans değişimleri.

4.1.15. Lifsiz-kuru aloe vera (Sarısabır otu)

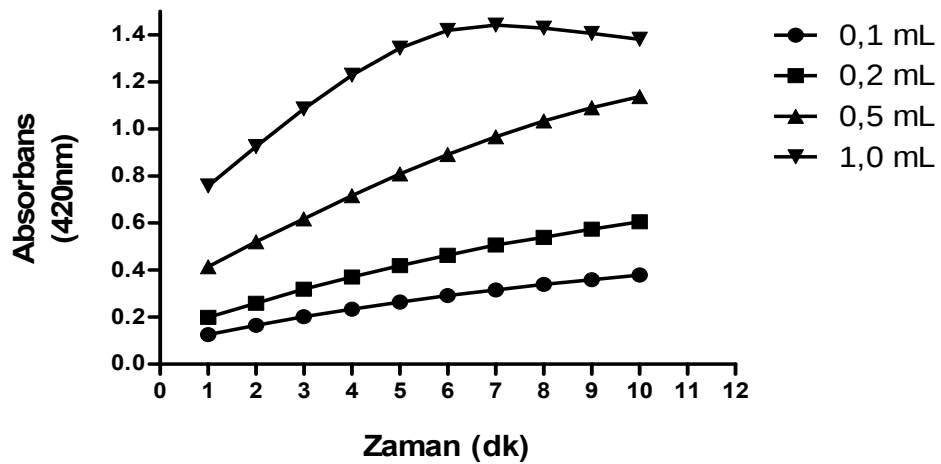
Lifsiz aloe vera (kuru) ekstraktı miktarına bağlı olarak absorbans değişimleri Şekil-4.15 de verilmiştir.



Şekil-4.15. : Aloe vera (kuru-lifsiz) ekstraktının farklı hacimlerinin spektrofotometredeki absorbans değişimleri.

4.1.16. Anamur muzı kabuğu

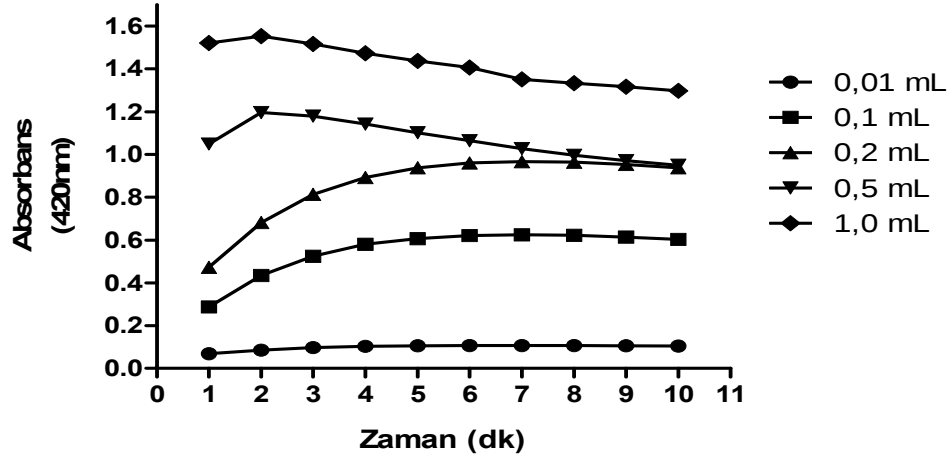
Anamur muzı kabuğu ekstraktı miktarına bağlı olarak absorbans değişimleri Şekil-4.16 da verilmiştir.



Şekil-4.16. : Anamur muzı kabuğu ekstraktının farklı hacimlerinin spektrofotometredeki absorbans değişimleri.

4.1.17. Patlıcan

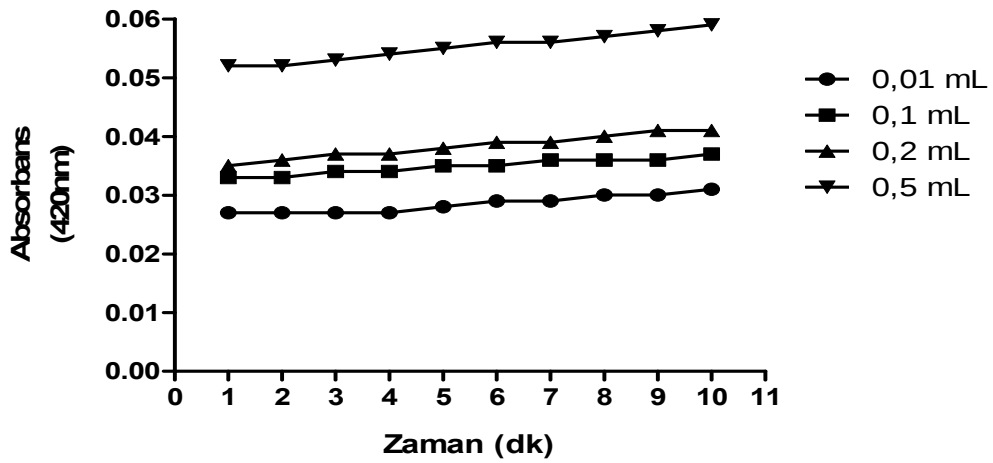
Patlıcan ekstraktı miktarına bağlı olarak absorbans değişimleri Şekil-4.17 de verilmiştir.



Şekil-4.17. : Patlıcan ekstraktının farklı hacimlerinin spektrofotometredeki absorbans değişimleri.

4.1.18. Trabzon hurması

Trabzon hurması ekstraktı miktarına bağlı olarak absorbans değişimleri Şekil-4.18 de verilmiştir.



Şekil-4.18. : Trabzon hurması ekstraktının farklı hacimlerinin spektrofotometredeki absorbans değişimleri.

4.2. PPO Aktivitesi Yüksek Olan Doku Ekstraktlarının Protein tayinleri

Spektrofotometrik analiz sonucunda PPO aktivitesi yüksek bulunan ayva, yerelması, bakla ve Anamur muzı kabuğu ekstraktları Lowry yöntemine göre toplam protein miktarları tayin edildi ve ilgili sonuçlar Tablo-4.1 de verilmiştir.

Tablo-4.1. : PPO aktivitesi yüksek olan dokuların toplam protein miktarları.

DOKULAR	Ayva	Yerelması	Bakla	Muz kabuğu
Protein miktarları (mg/ml.ekstrakt)	0,200	0,369	0,141	0,068

Aynı zamanda PPO aktivitesi yüksek bulunan bu dokuların spektrofometrede ilk 3 dakikada okunan absorbands değerleri kullanılarak spesifik aktiviteleri hesaplandı. Hesaplanan spesifik aktivite değerleri de Tablo-4.2 de verilmiştir.

Tablo-4.2. : Ayva, yerelması, bakla ve muz kabuklarının 20 °C de ve 0,02 M kateşol (0,02 M pH:7,0 fosfat tamponunda hazırlanmış) substratına karşı spesifik aktivite değerleri.

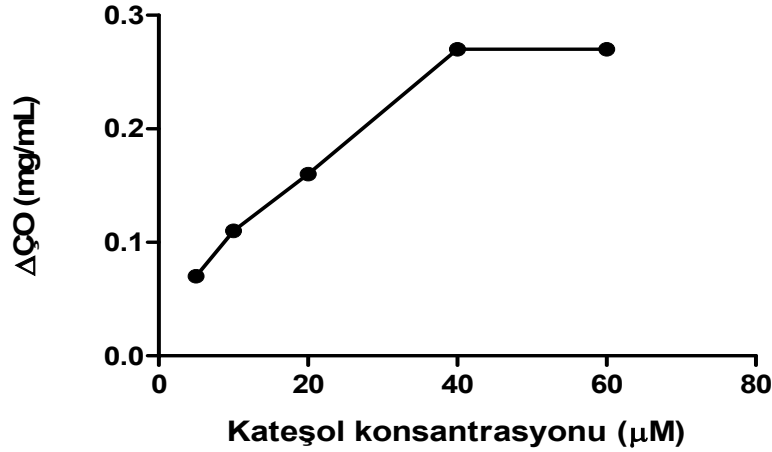
SPESİFİK AKTİVİTE DEĞERLERİ (U/mg enzim)				
DOKULAR	HAM ENZİM EKSTRAT DEĞERLERİ			
	0,1 ml	0,2 ml	0,5 ml	1 ml
Ayva	300	300	170	65
Yerelması	3360	1626	71	8
Bakla	638	319	1	0
Muz Kabukları	3677	2941	1985	1603

4.3. Hazırlanan Doku Biyosensörlerinin Ölçüm Aralığı Analiz Bulguları

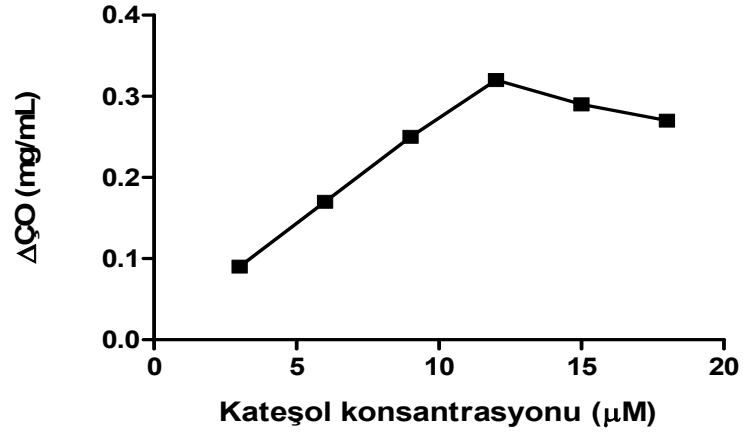
Muz kabuğu, yerelması ve bakla dokularının yüksek PPO aktivitesi göstermesinden dolayı, kateşol tayinine yönelik doku biyosensörleri materyal ve metotlar bölümünde anlatılan şekilde hazırlandı. Değişen kateşol konsantrasyonlarına karşılık pH=7,5; 50 mM fosfat tamponunda ve 37,5⁰C sıcaklığında hazırlanan biyosensörler ile reaksiyon ortamındaki çözünmüş oksijen miktarları ölçüldü ve biyosensör ölçüm cevapları olarak karşılaştırıldı. Ayrıca bakla biyosensörü ile doğal substratı olan L-Dopa substratı kullanılarak da ayrı bir ölçüm alındı ve kateşol substratı ile karşılaştırıldı.

Bu ölçümler biyosensörlerin doğru ve hassas ölçüm yapabilecekleri **lineer aralıkları** belirlemek amacıyla kullanılmaktadır.

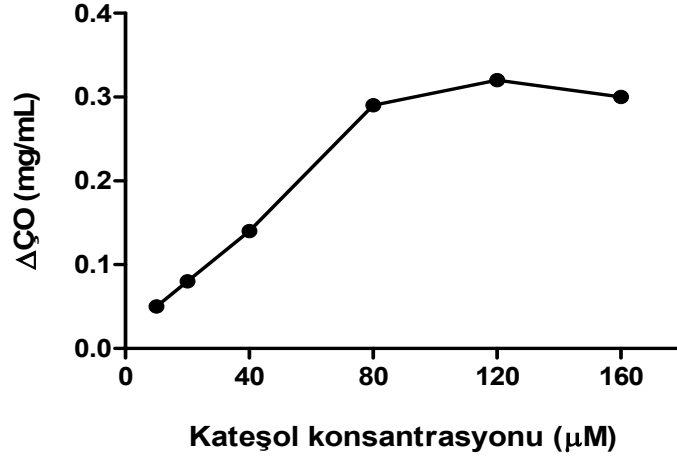
Hazırlanan biyosensörler ile elde edilen ölçüm aralıkları sırasıyla **muz kabuğu** için Şekil 4.19, **yerelması** için Şekil-4.20, **bakla** için kateşol substratlı grafik Şekil-4.21.a da ve L-Dopa substratlı grafik ise Şekil-4.21.b de verilmiştir.



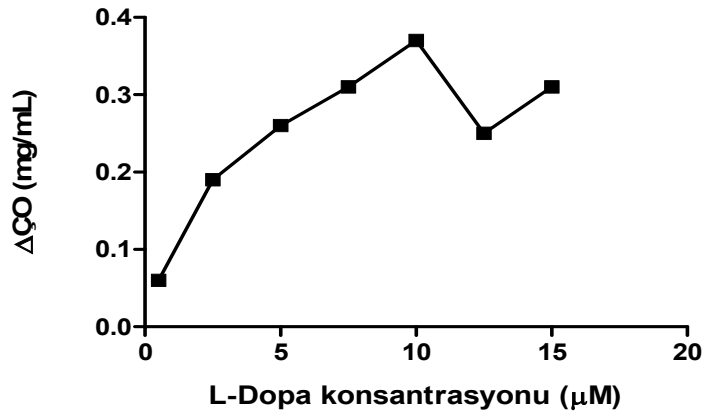
Şekil-4.19. : Muzu kabuğu biyosensörü için kateşol konsantrasyonuna karşı çözünmüş oksijen değişimi.



Şekil-4.20. : Yerelması biyosensörü için kateşol konsantrasyonuna karşı çözünmüş oksijen değişimi.



Şekil-4.21.a. : Bakla biyosensörü için kateşol konsantrasyonuna karşı çözünmüş oksijen değişimi.



Şekil-4.21.b. : Bakla biyosensörü için L-Dopa konsantrasyonuna karşı çözünmüş oksijen değişimi.

Sonuç olarak; grafiklerden de görülebileceği gibi 0-200 μM konsantrasyonu aralığında kateşol tayinine yönelik muz kabukları, yerelması ve bakla doku biyosensörleri kullanılarak alınan ölçümlerden; **yerelması** biyosensöründe 2-10 μM kateşol konsantrasyonu ile en düşük tayin sınırı aralığına ulaşıldı. İkinci sırada, **Muz kabuğu** biyosensörü 5-40 μM kateşol konsantrasyonu aralığında, **bakla** biyosensörüyle 10-100 μM kateşol konsantrasyonu aralığında tayin sınırları belirlendi.

Ayrıca, L-Dopa tayinine yönelik bakla doku biyosensörü ile de tayin sınırı 0,5-5 μM aralığında belirlendi. Görüldüğü gibi bakla doku biyosensörü L-Dopayı 20 kat daha düşük konsantrasyonlarını da belirlemektedir.

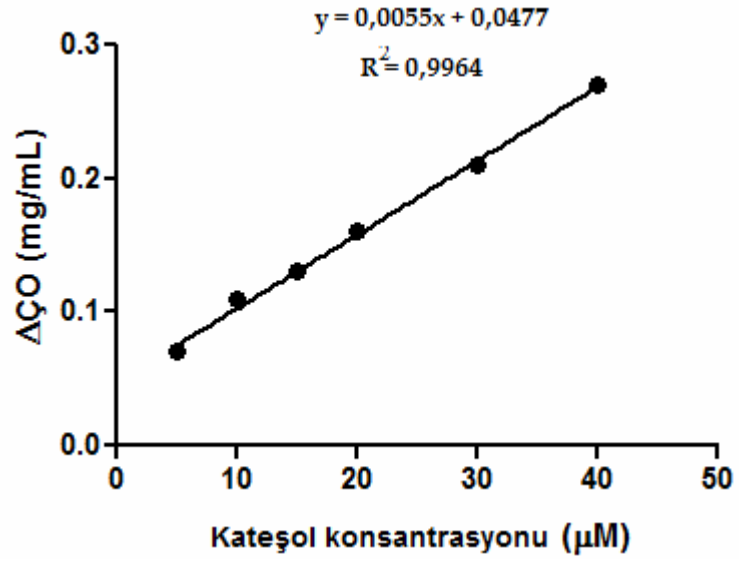
Hazırlanan biyosensörler içinde kateşolün düşük konsantrasyonlarındaki tayini için **yerelması** biyosensörü en uygundur. Ancak, **muz kabuğu** biyosensöründe tayin aralığı daha geniş olması bakımından tercih edilebilir. Çünkü, düşük kateşol konsantrasyon değerleri bakımından anlamlı bir fark yoktur.

L-Dopa tayininde ise **bakla** biyosensörü 0,5-5 μM L-dopa konsantrasyonu aralığında kullanılabilir bir biyosensör olduğu söylenebilir.

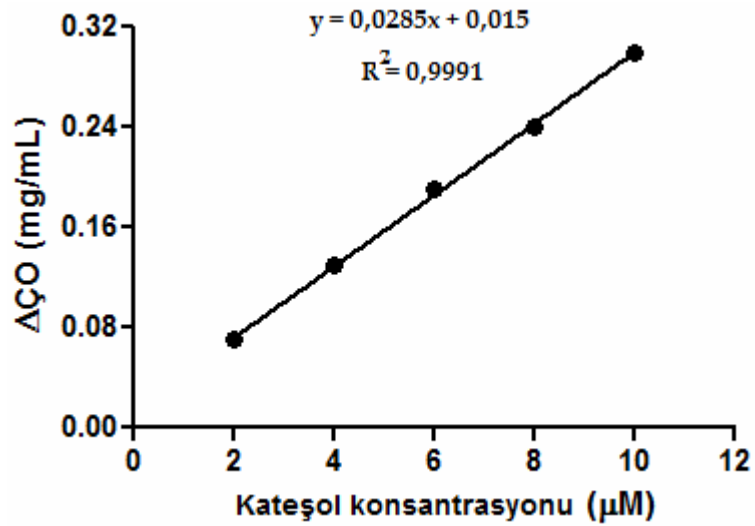
4.4. Doku biyosensörlerinin karakterizasyon çalışmalarına ilişkin bulgular

4.4.1. Lineer (doğrusal) aralık bulguları

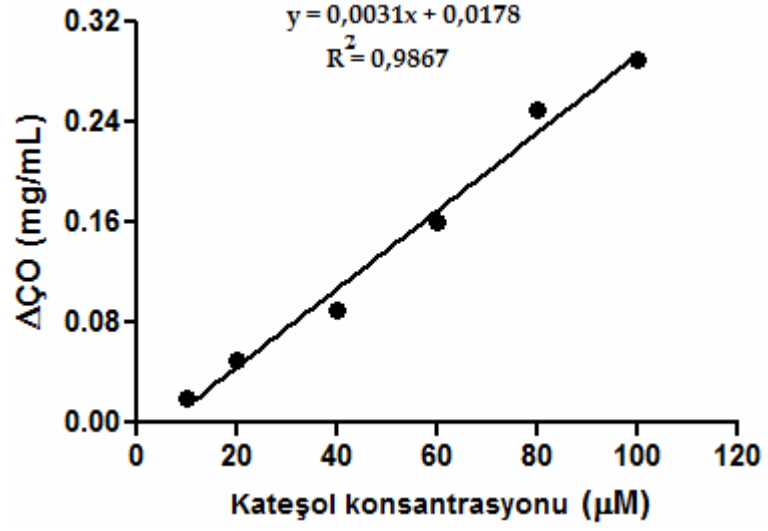
Doku biyosensörlerinin yukarıda bulunan farklı kateşol konsantrasyonlarında lineer aralıklarını belirlemek amacıyla; denemeler tekrarlandı. Eksik ara konsantrasyonlar aynı çalışma koşullarında (pH=7,5; 50 mM fosfat tamponu, 37,5⁰C) çalışıldı. Hazırlanan 3 adet doku biyosensöründen **muz kabuğu** doku sensörünün lineer aralığı Şekil-4.22 de, **yerelması** doku sensörünün lineer aralığı Şekil-4.23 de ve **bakla** doku sensörünün lineer aralığı Şekil-4.24 de ayrı ayrı verilmiştir. Ayrıca bakla doku biyosensörünün, farklı L-Dopa konsantrasyonlarında da elde edilen lineer aralığı da Şekil-4.25 de verilmiştir.



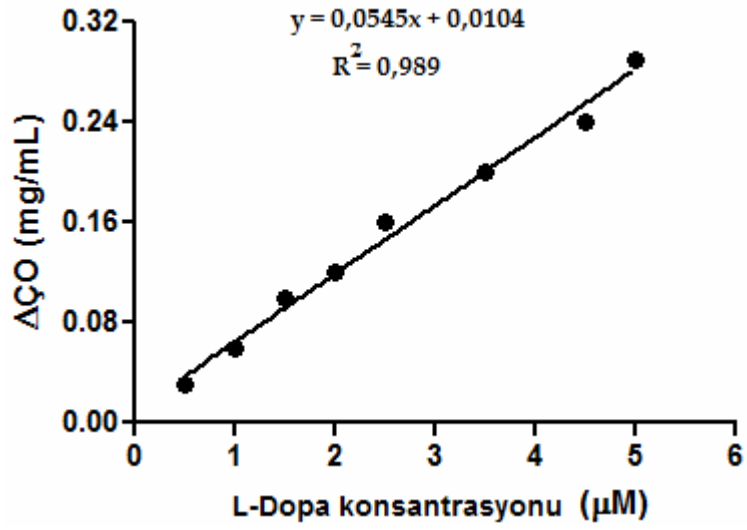
Şekil-4.22. : Muz kabuğu biyosensörünün lineer aralık kalibrasyon grafiği.



Şekil-4.23. : Yerelması biyosensörünün lineer aralık kalibrasyon grafiği.



Şekil-4.24. : Bakla biyosensörünün lineer aralık kalibrasyon grafiği.



Şekil-4.25. : Bakla biyosensörünün lineer aralık kalibrasyon grafiği.

Hazırlanan doku biyosensörlerinin içinde L-Dopa tayinine yönelik **bakla** doku homojenatı biyosensörü ile (0,5 µM) en düşük L-Dopa konsantrasyonunda ölçüm alındı.

4.3.2. Doku biyosensörlerinin tekrar kullanılabilirliği

Bu kısımda, hazırlanmış doku biyosensörlerinin tekrar kullanılabilirliği incelenmiştir. Her biyosensör için elde edilen yukarıdaki lineer aralık grafiklerinden grafiklerin orta bölgesindeki bir kateşol konsantrasyonu seçilerek, bu konsantrasyonda 37,5 °C sıcaklıkta ve 50 mM pH:7,5 Fosfat tamponlu çalışma şartlarında tekrar kullanılabilirlik ölçümleri gerçekleştirildi.

Muz kabuğu doku biyosensörü için 25 µM kateşol konsantrasyonu, **yerelması** doku biyosensörü için ise 8 µM kateşol konsantrasyonu, ve **bakla** doku biyosensörü için ise; 50 µM kateşol ve 3 µM L-dopa konsantrasyonu kullanılarak, 30 dakika ölçümler 6 şar kez tekrarlandı.

Bu işlemler sonucunda, kateşol tayinine yönelik değerler; **muz kabuğu** dokusu için standart sapma (S.D.) $\pm 0.3294 \mu\text{M}$ ve varyasyon katsayısı (C.V.) % 1.4, **yerelması** dokusu için standart sapma (S.D.) $\pm 0.0746 \mu\text{M}$ ve varyasyon katsayısı (C.V.) % 1 ve **bakla** dokusu için standart sapma (S.D.) $\pm 0.8392 \mu\text{M}$ ve varyasyon katsayısı (C.V.) % 2 olarak belirlendi. Aynı zamanda, **bakla** dokusu için L-Dopa tayinine yönelik değerler ise; standart sapma (S.D.) $\pm 0.0558 \mu\text{M}$ ve varyasyon katsayısı (C.V.) % 1.8 olarak belirlendi.

Tablo-4.3 de hazırlanan biyosensörlerin standart sapma ve varyasyon değerleri verilmiştir.

Tablo-4.3.: Doku biyosensörlerinin standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri.

Hazırlanan Doku Biyosensörleri	Standart Sapma(μM)	Varyasyon Katsayısı
Muz kabuğu	$\pm 0.3294 \mu\text{M}$	% 1.4
Yerelması	$\pm 0.0746 \mu\text{M}$	% 1
Bakla-(kateşol)	$\pm 0.8392 \mu\text{M}$	% 2
Bakla-(L-dopa)	$\pm 0.0558 \mu\text{M}$	% 1.8

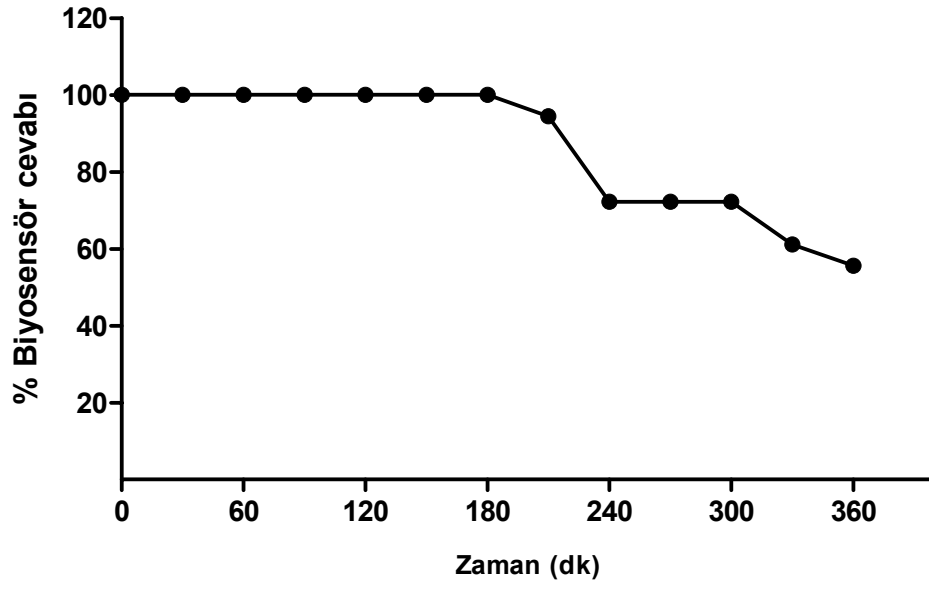
Sonuçlardan da görüldüğü üzere elde edilen standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri kabul edilebilir sınırlar içerisinde.

4.3.3. Operasyon kararlılığı

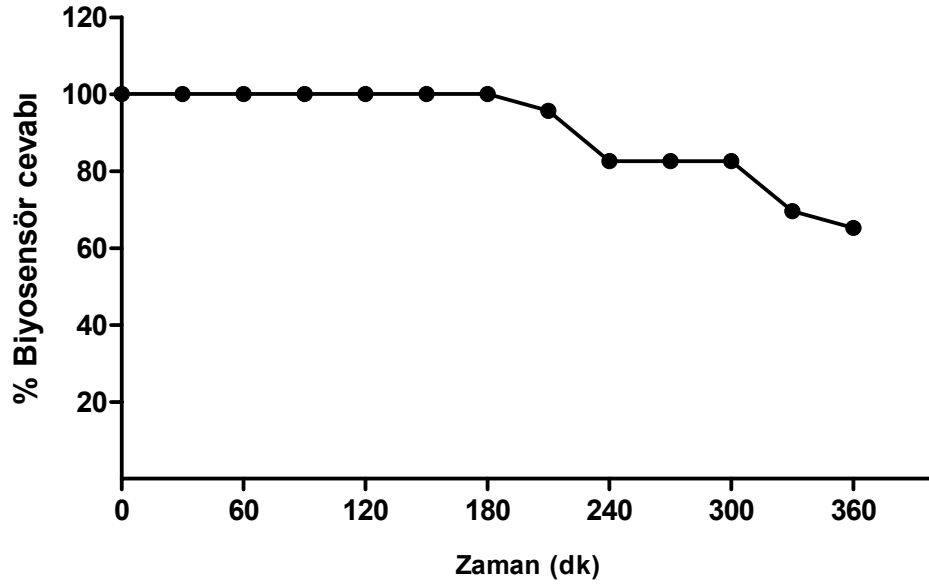
Hazırlanan biyosensörlerin operasyon kararlılıkları, aynı gün içinde aynı biyosensörle ardı ardına ne kadar süre ölçüm alınabileceğinin anlaşılması açısından önem taşımaktadır.

Biyosensörün işlem kararlılığının belirlenmesi amacıyla yeni hazırlanan biyosensörler daha önceden belirlenmiş olan çalışma sıcaklığında ve çalışma tamponu içinde bekletilerek 30 dakika aralıklarla, belirli bir kateşol standardı için (bakla doku için belirli bir L-dopa standardı içinde ayrı bir de ölçüm alındı) ölçümler gerçekleştirildi. 37,5 °C sıcaklıkta ve 50 mM, pH:7,5 fosfat tamponunda gerçekleştirilen denemelerde; **muz kabuğu** doku biyosensörü için 25 µM kateşol konsantrasyonunda, **yerelması** doku biyosensörü için ise 8 µM kateşol konsantrasyonunda, **bakla** doku biyosensörü için ise; 50 µM kateşol ve 3 µM L-dopa konsantrasyonlarında çalışılmıştır. Başlangıçta elde edilen biyosensör cevapları % 100 kabul edilerek 30 dakika aralıklarla yapılan ölçümlerde elde edilen biyosensör cevapları karşılaştırıldı.

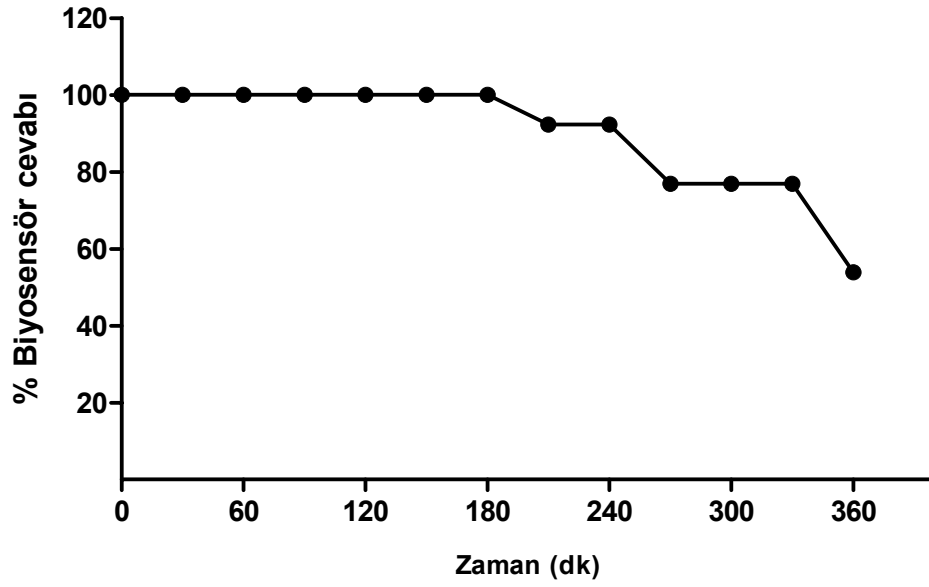
Denemeler sonucunda kateşol tayini için elde edilen operasyon kararlılıkları; **muz kabuğu** doku biyosensörünün Şekil-4.26 da, **yerelması** doku biyosensörünün Şekil-4.27 de, **bakla** doku biyosensörü Şekil-4.28 verilmiştir. Ayrıca, **bakla** doku biyosensörü için L-Dopa tayinine yönelik elde edilen operasyon kararlılığı ise Şekil-4.29 da görülmektedir.



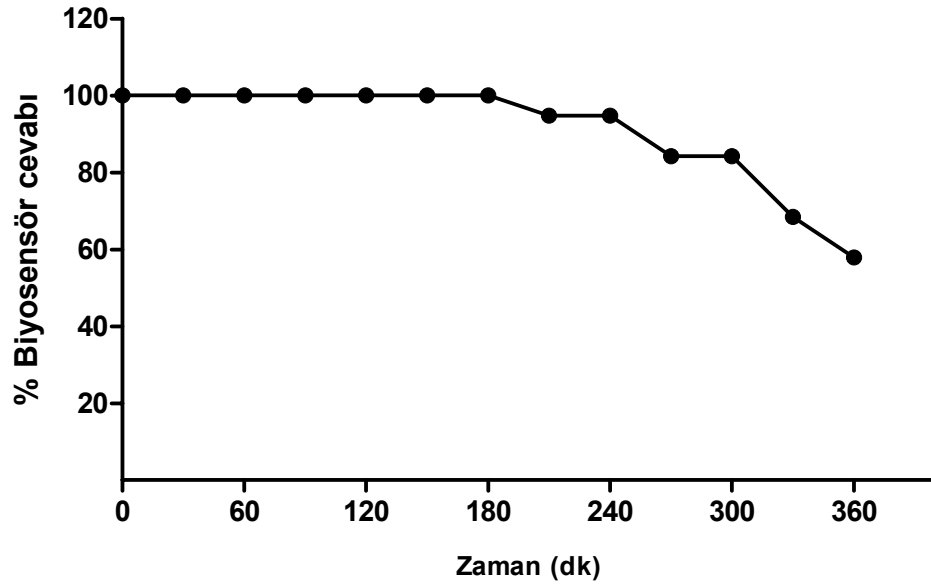
Şekil-4.26. : Muz kabuğu doku biyosensörünün kateşol tayinine yönelik operasyon kararlılığı.



Şekil-4.27. : Yerelması doku biyosensörünün kateşol tayinine yönelik operasyon kararlılığı.



Şekil-4.28. : Bakla doku biyosensörünün kateşol tayinine yönelik operasyon kararlılığı.



Şekil-4.29. : Bakla doku biyosensörünün L-Dopa tayinine yönelik operasyon kararlılığı.

Sonuç olarak; grafiklerden de görülebileceği gibi hazırlanan doku biyosensörlerinin hepsi, belirli substrat konsantrasyonunda 6 kez alınan ölçümden sonra aktivitelerinde belirli miktarlarda azalmalar oldu. Hazırlanan biyosensörler ile 30 dakika

aralıklarla 12' şer kez alınan ölçümler 360 dakika sürmüştür. Bu süre sonunda (kateşol tayinine yönelik) ; **muz kabukları** biyosensöründe % 45, **yerelması** biyosensöründe % 35 ve **bakla** biyosensöründe % 46 aktivite kaybı görüldü. Ayrıca, L-Dopa tayinine yönelik **bakla** biyosensörünün aktivitesinde de % 42 azalma görüldü.

5. TARTIŞMA

Fenolik bileşikler, organik kirleticilerin büyük bir grubunu oluşturmaktadır. Bu bileşikler pek çok endüstriyel proseste kullanılmak da olup aynı zamanda birçok doğal organik bileşiğin yıkım ürünüdürler. Belirli fenoller ve bazı aromatik bileşikler yüksek toksisiteye sahip olup, kanserojen ve alerjen özellik gösteren maddelerdir.

Fenolik bileşik tayinine yönelik olarak spektrofotometrik, titrimetrik, amperometrik, HPLC ya da elektrokimyasal dedeksiyon ve kemilüminesans içeren farklı metotlar kullanılmaktadır. Ancak, bunlar oldukça zaman alıcı ve özel ekipmanlar gerektiren sistemlerdir. Biyosensörler bu tip sistemlere kıyasla oldukça pratik ve çabuk sonuç veren yöntemlerdir.

Özellikle ticari enzim preparatlarının yerine ilgili enzimi yüksek oranda içerdiği bilinen dokuların biyobileşen olarak kullanıldığı doku biyosensörlerinin kullanımı ile hazırlanan sistemler oldukça pratik ve ekonomik tayin yöntemlerini oluşturmaktadır.

Bu tez projesinde öncelikle kateşol substrat olarak kullanan PPO enzimi bakımından zengin olan bitki dokuları spektrofotometrik metot kullanarak belirlendi ve PPO aktivitesi yüksek olan dokular oksijen elektrotu yüzeyine immobilize edilerek kateşol için verdikleri biyosensör cevapları ve tayin aralıkları belirlendi ve karşılaştırıldı.

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde geliştirilen sistemin çoğu laboratuarda kolaylıkla gerçekleştirilebilecek ölçümleri mümkün kılan pratik ve ekonomik bir sistem olduğu ortadadır. Bu aşamada özellikle fenolik yapı olarak kateşol (ve bakla için L-dopa) içeren preparatlarda ölçümün daha uygun olacağı açıktır. Ancak, bu durum doku biyosensörleri için bir dezavantaj olmayıp, PPO gibi grup spesifikliğine sahip tüm enzimleri içeren ve literatürlerde de yaygın olarak karakterize edilmiş sistemler için ortak bir problemdir. Dolayısıyla analiz sonuçlarının total kateşol yükü olarak verilebileceği analizlerde, herhangi bir dezavantaj bulunmamakla birlikte ucuz, saflaştırma adımlarının elimine edilmesi ve ticari preparat gereksinimini ortadan kaldırması açısından oldukça pratik bir sistemdir.

Bu çalışmanın ortaya çıkış noktası, öncelikle, PPO enzimini yüksek oranda içeren, tekrarlanabilirliği yüksek ölçümleri mümkün kılacak sistemlerin elde edilmesidir. Çünkü ileriye yönelik planlanan ve minyatürize biyoanalitik sistemler ve farklı komposit membranların bir biyobileşeni olarak yüksek PPO aktivitesine sahip taze Anamur muz kabukları, yerelması ve bakla dokularının çeşitli fenolik bileşiklerin analizinde kullanılabileceği oldukça açıktır.

6. EKLER

6.1. Spektrofotometrik tarama verileri

6.1.1. Trabzon kokulu üzümü (siyah üzüm) ekstrakt değerleri

Zaman (dk)	Absorbans (420 nm)			
	Alınan Ekstrakt Hacimleri			
	0,1 mL	0,2 mL	0,5 mL	1,0 mL
1	0,061	0,077	0,143	0,236
2	0,065	0,081	0,147	0,24
3	0,069	0,084	0,152	0,245
4	0,074	0,087	0,157	0,251
5	0,078	0,091	0,163	0,257
6	0,082	0,094	0,167	0,264
7	0,082	0,098	0,172	0,271
8	0,084	0,101	0,176	0,277
9	0,086	0,103	0,181	0,284
10	0,087	0,105	0,186	0,29

6.1.2. Yerelması ekstrakt değerleri

Zaman (dk)	Absorbans (420 nm)			
	Alınan Ekstrakt Hacimleri			
	0,1 mL	0,2 mL	0,5 mL	1,0 mL
1	0,358	0,425	0,878	1,216
2	0,597	0,699	0,915	1,233
3	0,729	0,785	0,917	1,208
4	0,838	0,848	0,898	1,18
5	0,882	0,85	0,876	1,168
6	0,917	0,831	0,856	1,149
7	0,938	0,807	0,846	1,137
8	0,943	0,795	0,83	1,116
9	0,943	0,771	0,818	1,111
10	0,933	0,751	0,804	1,089

6.1.3. Alabaş sebzesi ekstrakt değerleri

Zaman (dk)	Absorbans (420 nm)				
	Alınan Ekstrakt Hacimleri				
	0,01 mL	0,1 mL	0,2 mL	0,5 mL	1,0 mL
1	0,03	0,058	0,061	0,116	0,196
2	0,038	0,06	0,062	0,114	0,194
3	0,044	0,059	0,061	0,112	0,194
4	0,049	0,059	0,061	0,111	0,193
5	0,052	0,058	0,062	0,111	0,192
6	0,054	0,058	0,062	0,111	0,192
7	0,055	0,057	0,062	0,111	0,191
8	0,056	0,057	0,062	0,11	0,191
9	0,057	0,057	0,062	0,11	0,191
10	0,058	0,057	0,063	0,11	0,191

6.1.4. Alabaş tohumu ekstrakt değerleri

Zaman (dk)	Absorbans (420 nm)			
	Alınan Ekstrakt Hacimleri			
	0,1 mL	0,2 mL	0,5 mL	1,0 mL
1	0,182	0,255	0,628	1,117
2	0,182	0,256	0,632	1,154
3	0,181	0,258	0,637	1,192
4	0,183	0,257	0,636	1,225
5	0,183	0,258	0,638	1,256
6	0,185	0,259	0,638	1,271
7	0,184	0,26	0,639	1,287
8	0,185	0,26	0,64	1,305
9	0,186	0,261	0,641	1,316
10	0,187	0,261	0,643	1,326

6.1.5. Ayva ekstrakt değerleri

Zaman (dk)	Absorbans (420 nm)			
	Alınan Ekstrakt Hacimleri			
	0,1 mL	0,2 mL	0,5 mL	1,0 mL
1	0,049	0,07	0,108	0,173
2	0,058	0,087	0,132	0,192
3	0,066	0,106	0,16	0,211
4	0,073	0,123	0,188	0,231
5	0,079	0,135	0,213	0,25
6	0,084	0,146	0,235	0,269
7	0,088	0,155	0,255	0,286
8	0,093	0,162	0,271	0,302
9	0,095	0,169	0,285	0,317
10	0,097	0,174	0,297	0,331

6.1.6. Bakla ekstrakt değerleri

Zaman (dk)	Absorbans (420 nm)			
	Alınan Ekstrakt Hacimleri			
	0,1 mL	0,2 mL	0,5 mL	1,0 mL
1	0,091	0,125	0,24	0,41
2	0,106	0,144	0,248	0,41
3	0,119	0,151	0,25	0,411
4	0,128	0,153	0,251	0,412
5	0,137	0,155	0,252	0,413
6	0,143	0,156	0,253	0,414
7	0,147	0,158	0,255	0,416
8	0,151	0,16	0,256	0,418
9	0,154	0,161	0,257	0,42
10	0,157	0,162	0,258	0,421

6.1.7. Bezelye ekstrakt değerleri

Zaman (dk)	Absorbans (420 nm)			
	Alınan Ekstrakt Hacimleri			
	0,1 mL	0,2 mL	0,5 mL	1,0 mL
1	0,123	0,198	0,443	0,855
2	0,123	0,195	0,439	0,846
3	0,122	0,194	0,436	0,843
4	0,121	0,192	0,433	0,839
5	0,121	0,193	0,433	0,835
6	0,12	0,192	0,431	0,831
7	0,121	0,191	0,431	0,83
8	0,121	0,191	0,43	0,829
9	0,121	0,191	0,429	0,827
10	0,121	0,191	0,429	0,827

6.1.8. Enginar ekstrakt değerleri

Zaman (dk)	Absorbans (420 nm)				
	Alınan Ekstrakt Hacimleri				
	0,01mL	0,1 mL	0,2 mL	0,5 mL	1,0 mL
1	0,031	0,052	0,077	0,161	0,293
2	0,032	0,054	0,078	0,161	0,292
3	0,035	0,056	0,08	0,162	0,292
4	0,035	0,058	0,082	0,163	0,294
5	0,035	0,059	0,084	0,164	0,295
6	0,035	0,06	0,085	0,165	0,296
7	0,036	0,06	0,086	0,166	0,296
8	0,036	0,061	0,086	0,166	0,297
9	0,036	0,061	0,087	0,166	0,297
10	0,036	0,061	0,087	0,167	0,299

6.1.9. Fasulye (yeşil) ekstrakt değerleri

Zaman (dk)	Absorbans (420 nm)			
	Alınan Ekstrakt Hacimleri			
	0,1 mL	0,2 mL	0,5 mL	1,0 mL
1	0,059	0,089	0,173	0,318
2	0,06	0,09	0,173	0,316
3	0,06	0,09	0,171	0,314
4	0,061	0,09	0,171	0,313
5	0,061	0,091	0,169	0,311
6	0,062	0,09	0,169	0,311
7	0,062	0,09	0,169	0,311
8	0,063	0,09	0,168	0,311
9	0,063	0,09	0,168	0,309
10	0,063	0,09	0,168	0,309

6.1.10. Güvem ekstrakt değerleri

Zaman (dk)	Absorbans (420 nm)			
	Alınan Ekstrakt Hacimleri			
	0,1 mL	0,2 mL	0,5 mL	1,0 mL
1	0,113	0,209	0,534	0,764
2	0,123	0,227	0,551	0,795
3	0,133	0,244	0,576	0,839
4	0,141	0,259	0,601	0,87
5	0,148	0,273	0,627	0,9
6	0,153	0,283	0,647	0,927
7	0,157	0,292	0,668	0,949
8	0,16	0,299	0,681	0,97
9	0,162	0,303	0,696	0,987
10	0,163	0,307	0,709	1,001

6.1.11. Kaktüs ekstrakt değerleri

Zaman (dk)	Absorbans (420 nm)			
	Alınan Ekstrakt Hacimleri			
	0,1 mL	0,2 mL	0,5 mL	1,0 mL
1	0,349	0,635	1,395	1,74
2	0,346	0,629	1,387	1,742
3	0,344	0,625	1,386	1,742
4	0,343	0,626	1,381	1,742
5	0,343	0,624	1,38	1,744
6	0,342	0,622	1,379	1,743
7	0,343	0,619	1,378	1,745
8	0,342	0,619	1,378	1,744
9	0,343	0,618	1,378	1,745
10	0,341	0,616	1,375	1,746

6.1.12. Kereviz ekstrakt değerleri

Zaman (dk)	Absorbans (420 nm)				
	Alınan Ekstrakt Hacimleri				
	0,01mL	0,1 mL	0,2 mL	0,5 mL	1,0 mL
1	0,042	0,118	0,183	0,378	0,705
2	0,052	0,125	0,188	0,379	0,704
3	0,059	0,124	0,187	0,377	0,702
4	0,063	0,124	0,187	0,375	0,701
5	0,066	0,124	0,186	0,373	0,7
6	0,067	0,124	0,185	0,373	0,7
7	0,068	0,123	0,184	0,371	0,7
8	0,068	0,123	0,183	0,371	0,701
9	0,068	0,123	0,183	0,371	0,702
10	0,068	0,123	0,183	0,371	0,703

6.1.13. Keçiboynuzu (kuru) ekstrakt değerleri

Zaman (dk)	Absorbans (420 nm)			
	Alınan Ekstrakt Hacimleri			
	0,1 mL	0,2 mL	0,5 mL	1,0 mL
1	0,033	0,055	0,082	0,186
2	0,033	0,055	0,082	0,187
3	0,034	0,056	0,083	0,188
4	0,034	0,057	0,084	0,189
5	0,034	0,057	0,084	0,191
6	0,034	0,058	0,085	0,192
7	0,034	0,059	0,087	0,194
8	0,035	0,059	0,088	0,196
9	0,035	0,06	0,088	0,198
10	0,035	0,061	0,089	0,199

6.1.14. Lifli aloe vera (kuru) ekstrakt değerleri

Zaman (dk)	Absorbans (420 nm)		
	Alınan Ekstrakt Hacimleri		
	0,1 mL	0,2 mL	0,5 mL
1	0,32	0,599	1,548
2	0,325	0,604	1,5
3	0,332	0,614	1,504
4	0,339	0,622	1,514
5	0,345	0,629	1,528
6	0,351	0,635	1,539
7	0,356	0,642	1,549
8	0,36	0,647	1,558
9	0,364	0,652	1,569
10	0,368	0,656	1,576

6.1.15. Lifsiz aloe vera ekstrakt değerleri

Zaman (dk)	Absorbans (420 nm)		
	Alınan Ekstrakt Hacimleri		
	0,1 mL	0,2 mL	0,5 mL
1	0,363	0,645	1,568
2	0,368	0,652	1,584
3	0,373	0,659	1,598
4	0,378	0,666	1,609
5	0,386	0,673	1,622
6	0,389	0,677	1,629
7	0,392	0,682	1,638
8	0,396	0,686	1,647
9	0,399	0,69	1,656
10	0,401	0,693	1,665

6.1.16. Anamur muzu kabuğu ekstrakt değerleri

Zaman (dk)	Absorbans (420 nm)			
	Alınan Ekstrakt Hacimleri			
	0,1 mL	0,2 mL	0,5 mL	1,0 mL
1	0,126	0,199	0,415	0,758
2	0,166	0,26	0,521	0,926
3	0,202	0,319	0,618	1,086
4	0,235	0,37	0,717	1,229
5	0,265	0,42	0,809	1,344
6	0,292	0,463	0,892	1,42
7	0,316	0,507	0,967	1,442
8	0,339	0,539	1,034	1,429
9	0,359	0,574	1,09	1,407
10	0,379	0,606	1,138	1,382

6.1.17. Patlıcan ekstrakt değerleri

Zaman (dk)	Absorbans (420 nm)				
	Alınan Ekstrakt Hacimleri				
	0,01mL	0,1 mL	0,2 mL	0,5 mL	1,0 mL
1	0,069	0,287	0,473	1,049	1,521
2	0,086	0,434	0,682	1,196	1,554
3	0,097	0,524	0,813	1,179	1,516
4	0,103	0,58	0,892	1,142	1,473
5	0,106	0,607	0,938	1,102	1,437
6	0,107	0,621	0,96	1,064	1,406
7	0,107	0,625	0,966	1,028	1,351
8	0,107	0,622	0,964	0,997	1,333
9	0,106	0,614	0,953	0,971	1,317
10	0,105	0,603	0,938	0,95	1,298

6.1.18. Trabzon hurması ekstrakt değerleri

Zaman (dk)	Absorbans (420 nm)			
	Alınan Ekstrakt Hacimleri			
	0,1 mL	0,2 mL	0,5 mL	1,0 mL
1	0,027	0,033	0,035	0,052
2	0,027	0,033	0,036	0,052
3	0,027	0,034	0,037	0,053
4	0,027	0,034	0,037	0,054
5	0,028	0,035	0,038	0,055
6	0,029	0,035	0,039	0,056
7	0,029	0,036	0,039	0,056
8	0,03	0,036	0,04	0,057
9	0,03	0,036	0,041	0,058
10	0,031	0,037	0,041	0,059

7. KAYNAKLAR

Abayomi, L.A. , Terry, L.A. , White,S.F. ve Warner, P.J. , 2006, Development of a disposable pyruvate biosensor to determine pungency in onions (*Allium cepa L.*), Biosensors And Bioelectronics, 21, 2176-2179

Akyılmaz E. , 1996, Preparation of ascorbate oxidase enzyme electrode and its usage for L-ascorbic acid determination, Master Of Thesis, E.Ü. Faculty of science, 11p.

Apak R. , Güçlü K. , Özyürek M. and Karademir S. E. , 2004, "A Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols, Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method" , Journal of Agricultural and Food Chemistry , 52, 7970-7981.

Apak R. , Güçlü K. , Ozyurek M. , Karademir S. E. and M. Altun, 2005, “Total antioxidant capacity assay of human serum using copper(II)- neocuproine as chromogenic oxidant: The CUPRAC method”, Free Radical Research, 39, 949-961

Baoxin, L. , Zhuzun, Z. , Yan, J. , 2002, Plant tissue based chemiluminescence flow biosensor for determination of unbound dopamine in rabbit blood with on-line microdialysis sampling, Biosensor and Bioelectronic, 17, 585-589

Brenes, M. , Romero, C. , Garcia, A. , Hidalgo F.J.ve Ruiz-Méndez, 2004, Phenolic compounds in olive oils intended for refining: formation of 4-Ethylphenol during olive paste storage, J Agric Food Chem 52:8177-8181

Canada, 2007, Canadian Environmental Protection Act, 1999. Notice with respect to certain substances on the Domestic Substances List (*DSL*). Ottawa: Public Works and Government Services.Canada Gazette, Part I, Vol. 141, No.5. p. 165-177. Available from:

Canada, 2000, Canadian Environmental Protection Act.: Persistence and Bioaccumulation Regulations, P.C. 2000-348, 23 March, 2000, SOR/2000-107, Canada Gazette. Part II, vol. 134, no. 7, p. 607–612. Ottawa: Queen’s Printer. Available from: <http://canadagazette.gc.ca/partII/2000/20000329/pdf/g2-13407.pdf>

Chen, J.S. ; Cheng-i, W. ve Marshall, M.R. , 1991, Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase, Journal Of Agricultural and Food Chemistry, 39, 11, 1897-1901

Chevalier, T. , Rigal, D. , Didier, M. , Frederic, G. , Forget, F.R. ve Fils-Lycaon, B.R. , 1999, Molecular cloning and characterization of apricot fruit polyphenol oxidase, Plant Physiol. , 119(4), 1261-1270

Climent P.V. ; Serralheiro M.L.M. ve Rebelo M.J.F. , 2001, Development of a new amperometric biosensor based on polyphenoloxidase and polyethersulphone membrane, Pure Applied Chemistry, 73(12),1993-1999

Coulet, P. R. , 1991, "What is a Biosensor?" Chapter 1; " Biosensor principles and applications", Ed: Blum, L. J., Coulet, P. R, Marcel Dekker Inc., New York, sayfa 1-6.

Dinçkaya E. , 1999, Enzim sensörleri, Biyosensörler, Biyokimya Yaz Okulu Kitabı, (Ed. Telefoncu A.), s 81-142pp

Dinçkaya , E. ve Telefoncu , A. , 1993, Enzyme Electrode Based on Oxalate Oxidase Immobilized in Gelatin for Specific Determination of Oxalate, Indian J. Biochemistry, Biophys, 30, 282-284

D' Orazio, P. ,2003, Biosensors in clinical chemistry, Clinica Chemica Acta, 334, 41-69

Duran, N. ve Esposito, E. , Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compound in wastewater and soil treatment:a review, Applied Catalysis B:Environmental, 28, 83-99.

Epiwin, 2004, Estimation Programs Interface for Microsoft Windows, Version 3.12. Washington (DC): U.S. Environmental Protection Agency, Office of Pollution Prevention and Toxics; Syracuse (NY): Syracuse Research Corporation. Available from: www.epa.gov/oppt/exposure/pubs/episuite.htm.

Fiamegos Y.C. ; Kefala A.P. ve Stalikas C.D., 2008, Ion-pair single-drop microextraction versus phase-transfer catalytic extraction for the gas

chromatographic determination of phenols as tosylated derivatives, Journal of Chromatography A, 1190, 44-51

Gomez-Lopez, V.M. , 2002, Some biochemical properties of polyphenol oxidase from two varieties of avocado, Food Chemistry, 77, 163-169.

Gutes A. , Cespedes F. , Alegret S. ve Del Valle M. , 2005, Determination of phenolic compounds by a polyphenol oxidase amperometric biosensor and artificial neural network analysis, Biosensors and Bioelectronics, 20, 8, 1668-1673

Haghighi, B. ; Gorton, L. ; Ruzgas, T. ; Jonsson, L.J. , 2003, Characterization of graphite modified with laccase from trametes versicolor and their use for bioelectrochemical monitoring of phenolic compound in flow injection analysis. Analytica Chimica Acta, 487, 3-14

Hagiwara, A. ; Takesada, Y. ; Tanaka, H. , Tamano, S. ; Hirose, M. ; Ito, N. ve Shirai T. , 2001, Dose-dependent induction of glandular stomach preneoplastic and neoplastic lesions in male F344 rats treated with catechol chronically, Toxicol Pathol, 29(2), 180-186

<http://bitkisel.mutlupartner.net/v-y-harfli-bitkiler/v-y-harfli-bitkiler2.html>

<http://cevre.club.fatih.edu.tr/webyeni/konfreweb/konu13.pdf>, (Arslan H. , Atik Sularda Fenol tayini ,Gazi Universitesi, Fen Edebiyat Fakultesi, Kimya Bolumu)

<http://en.wikipedia.org/wiki/Catechol>

<http://en.wikipedia.org/wiki/L-Dopa>

<http://www.bitkisel tedaviyontemleri.com>

<http://www.kırık tabak.com>

<http://www.resim motoru.com>

http://www.sci.ege.edu.tr/~eubio/yaz_okulu/biosensör.htm

Junhui, Z. ; Hong, C. ; Ruifu, Y. , 1997, DNA based biosensors, Biotechnology Advances, 15 (1), 43-58

- Kahoun D. v.d. , 2008, Determination of phenolic compounds and hydroxymethylfurfural in meads using high performance liquid chromatography with coulometric-array and UV detection, Journal of Chromatography A, 1202, 19-33**
- Karakuş, E. , Pekyardımcı, Ş. , Kılıç, E. , 2005, Urea biosensors based on PVC membrane containing palmitic acid, Taylor and Francis, 33, 329-341**
- Kim, M. , 2006, Determining citrate in fruit juices using a biosensor with citrate lyase and oxaloacetate decarboxylase in a flow injection analysis system, Food Chemistry, 99, 851-857**
- Leonard, P. ; Hearty, J. ; Brennan, J. ; Dunne, L. ; Quinn, J. ; Chakraborty, T. ; O’Kennedy, R. ; 2003, Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water. *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 3-13.**
- Lima L.D.L. , Duarte A.C. ve Esteves V.I. , 2007, Optimization of phenolic compounds analysis by capillary electrophoresis, Talanta, 72, 1404-1409**
- Macholan, L. , 1987, Recent progress in developing enzyme and tissue-based membrane electrodes, Acta Biotechnol, 7, 69, 547-553**
- Malhotra, B.D. ve Chaubey, A. , 2003, Biosensors for clinical diagnostics industry, *Sensors and Actuators B*, 91, 117-127**
- Marshall, M.R. ; Jeongmok, K. ve Cheng-I W. , 2000, Enzymatic Browning in Fruits, Vegetables and Seafoods, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), [cited 2007 July 5]. Available from: <http://www.fao.org/ag/ags/agsi/ENZYMFINAL/Enzymatic%20Browning.html>.**
- Mascini, M. ; Palcchetti, I. ve Marrazza, G. ,2001, DNA electrochemical biosensors, *Fresenius J Anal Chemistry*, 369, 15, 22**
- McDonald, T.A. , Holland, N.T. , Skibola, C. , Duramad, P. ve Smith, M.T. , 2001, Hypothesis: phenol and hydroquinone derived mainly from diet and gastrointestinal flora activity are causal factors in leukemia. *Leukemia* 15:10-20**

Ncasi, 2007, National Council for Air and Stream Improvement [Factsheet], Draft Forest Products Industry Catechol Fact Sheet Revision 2.0 30/08/07 (unpublished)

Öztürk N. , Tunalier Z. , Koşar M. Ve Başer K.H.C. , 2002, ‘*Petroselinum crispus*, *Anethum graveolens* ve *Eruca sativa* ‘nın antioksidan etki ve fenolik bileşikler yönünden incelenmesi, 14. Bitkisel İlaç Ham Maddeleri ve Bildirimleri-Eskişehir, ISBN 975-94077-2-8

Pekyardımcı, Ş. , 1992, Polifenol oksidaz enzimi ve esmerleşme reaksiyonlarının Gıda endüstrisi uygulamaları, Gıda Teknolojisi Derneği (GTD) Yayın Organı, 17, 3, 182

Pivideri, M.I. ; Merkoçi, A. ve Alegret, S. , 2000, Electrochemical genosensor design: Immobilization of oligonucleotids onto transducer surfaces and detection methods, Biosensors and Bioelectronics, 15, 291-303

Portacio, M. v.d. , 2006, Biosensors for phenolic compounds: The catechol as a substrate model, Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 41, 97-102

Sağiroğlu, A. , 2003, Bitkisel Doğal Bileşikler Kimyası, Trakya Üni. Fen-Edebiyat Fak. Kimya Bölümü Biyokimya anabilim dalı, 12-13

Screening Assessment for 1,2-Benzenediol (Catechol), 2008, Chemical Abstracts Service Registry Number: 120-80-9

Şerbetçi, Z. , Alkan, C. , 2008, 4-(1h-İmidazo[4,5-F][1,10]Fenantrolin-2-İl)-N,N - Dimetilbenzenamin Ligandı Ve Metal Komplekslerinin Sentez Ve Karakterizasyonu, Fırat Üniversitesi Fen ve Müh. Bilim Dergisi, 20 (1), 91-97

Sezgintürk, M.K. , Dinçkaya, E. ve Teke, M. ,2007, Kateşol tayinine yönelik bitki doku homojenatı temelli bir biyosensör ve karakterizasyonu, 21. Ulusal Kimya Kongresi-İnönü üniversitesi,

Sezgintürk, M.K. , Dinçkaya, E. , 2005, An amperometric inhibitor biosensor for the determination of reduced glutathione (GSH) without any derivatization in some plants, Biosensors And Bioelectronics, 19, 835-841

Sezgintürk, M.K. ve Dinçkaya, E. , 2005, Direct Determination of sulfide in food samples by a biosensor based on plant tissue homogenate, Talanta, 65, 998-1002

Sezgintürk, M.K. ; Dinçkaya, E. ve Akyılmaz, E. , 2003, A novel biosensor based on urate oxidase-peroxidase coupled enzyme system for uric acid determination in urine, Talanta, 61(2), 73-79.

Sezgintürk, M.K. , 2002, Glutasyon tayinine yönelik biyosensör geliştirilmesi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü-Yüksek Lisans tezi, 79 sayfa

Sharma, S.K. ; Sehgal, N. Ve Kumar, A. , 2003, Biomolecules for development of biosensor and their applications, Current Applied Physics, 3, 307-316

Sidwell, J.S. , Rechnitz, G.A. , 1986, Progressand challenges for biosensors using plant tissue materials, Biosensors And Bioelectronics, 2 (4), 221-233

Singh, J. ; Gupta, K. ve Arora S.K. , 1994, Changes in the anti-nutritional factors of developing seeds and pod walls of fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.). Plant Foods Hum Nutr 46:77-84

Singh , S. , Singhal, R. Ve Malhotra B.D. , 2007, Immobilization Of cholesterol esterase and cholesterol oxidase onto sol-gel for application to cholesterol biosensor, Analytica Chimica Acta, 582, 335-343

Srisawasdi, P. v.d. , 2006, Application of *Streptomyces* and *Brevibacterium* cholesterol oxidase for total serum cholesterol assay by the enzymatic kinetic method, Clinica Chimica Acta, 372, 103-111

Sternitzke, A. , Legrum, W. ve Netter, K.J. , 1992, Effects of phenolic smoke condensates and their components on hepatic drug metabolizing systems, Food Chem Toxicol 30(9):771-781

Telefoncu, A. , 1999, Biyokimya Lisans Üstü Yaz Okulu-Biyosensörler, (Telefoncu,A., v.d.), Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi-İzmir, sayfa:1-2

Timur, S. V.d. , 2003, Detection of phenolic compounds by thick film sensors based on

Turner, A. P. F. , 1987, "Biosensors: Fundamentals and Applications", Ed: Turner, A. P. F., Karube, I. and Wilson, G. S.; Oxford University Press, Oxford, sayfa 5-7.

Uslan, A.H. , 1999, İmmunosensörler, Biyokimya Yaz Okulu Kitabı, Biosensörler (Editör Azmi Telefoncu), 194-205

Vamos-Vigyazo, L. , 1981, Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables, CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr. , 14, 49-123

Walker, J.R.L. , 1977, Enzymic browning in foods: Its chemistry and control, Food Tec, 12, 3, 19, 25

Wang, J. , Naser, N. , 1991, Reticulated vitreous carbon-plant tissue composite bioelectrodes, Analytica Chimica Acta, 242, 259-265

Wu, S. V.d. , 2007, A wireless magnetoelastic α -amylase sensor, Sensors and Actuators B, 121, 476-481

Yağar, H. , 2000, Ayva polifenol oksidazının çeşitli taşıyıcılara immobilizasyonu ve karakterizasyonları, Trakya üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Edirne-2000

Yağar, H. , 1994, Ayva (*Cydonia Oblang*) polifenol oksidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu, Trakya üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi-Edirne, 39-40

Yıldız, A. ; Genç, Ö. ve Bektaş, S. , 1997, Enstrümantal Analiz Yöntemleri, Hacettepe Üniversitesi Yayınları A-64, İkinci Baskı, sayfa-1

Yıldız, H.B. , Toppare L. , Gürsel Y.H. ve Yağci Y. , 2006, Immobilization of polyphenol oxidase in conducting graft copolymers and determination of phenolic amount in red wines with enzyme electrodes, Enzyme and Microbial Technology, 39, 4, 945-948

YTÜ Çevre Müh. Böl. Çevre Kimyası 2 Lab. Notları

TEŞEKKÜR

Çalışmalarında bana, teşviklerini ve yardımlarını esirmeyen, kendisi ile böyle bir çalışma olanağı tanıyan danışmanım, Değerli Hocam **Doç. Dr. Ayten SAĞIROĞLU'** na en içten sevgi ve saygılarımı sunarım.

Ayrıca, , çok değerli aileme, desteğiyle hep yanımda olan **Sinem GÜLCAN' a**, benden yardımlarını esirgemeyen **Arş. Gör. Hakkı M. ÖZCAN'a** ve bölümdeki bütün hocalarıma teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Trabzon'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi İstanbul'da yaptım. 2001 yılında Trakya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümüne girdim. 2005 yılında mezun oldum ve 2005-2006 öğretim yılının bahar döneminde Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya bölümünde tezli yüksek lisansa başladım ve halen devam etmekteyim.

Özhan HASANÇEBİ